



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización del crecimiento y del
procesamiento de la proteína de la cápside del
astrovirus neurotrópico VA1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

CATALINA IGNACIA AGUILERA FLORES



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

*A Marcela Flores Briell y
Marcelo Aguilera Contador*

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Marcela y Marcelo, que siempre me han apoyado y guiado con su amor incondicional para que yo pueda seguir mis sueños. Sin ustedes no estaría escribiendo esto.

A mi familia, por siempre darme ánimos y creer en mi cuando yo no lo pude hacer, por siempre hacerme sentir en casa.

A mi Po, por amarme, cuidarme y siempre desear verme feliz.

A mi Mateo, por toda la compañía y amor que me diste en los mejores y peores momentos.

A mis mejores amigos, Samu, Pau, Paulita, Eddie, Kevin, Colu, Daph e Hiram por enseñarme que las amistades son para siempre y que junto a ustedes todo saldrá bien.

Al Dr. Carlos Arias por enseñarme tanto y al laboratorio GAL por permitirme aprender y crecer en esta área tan bonita que es la virología.

A mis compañeros de laboratorio, a Xaira por siempre apoyarme y darme buenos consejos, a Tomás, Naye y Lety por enseñarme tanto sobre los astrovirus y hacerme siempre sentir feliz de estar ahí. A Jey por siempre hecharme porras y ayudarme con mis cálculos.

También me gustaría agradecer la asesoría y el excelente apoyo técnico propocionado por la QFB. Rafaela Espinosa y por el M. en C. Marco Antonio Espinoza durante el desarrollo del presente trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
Generalidades de los astrovirus	10
Astrovirus que infectan humanos	11
Asociación de los nuevos astrovirus de humano con enfermedades neurológicas	13
Organización del genoma de los astrovirus	14
Estructura del virus	15
Ciclo de replicación	17
Entrada y unión.....	17
Traducción y replicación del genoma.....	19
Ensamble y salida	22
ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
METODOLOGÍA	26
Células y virus	26
Determinación del título de virus infeccioso	26
Western blot	27
Purificación de partículas virales	27
Evaluación de la producción de proteína y título viral en varios medios	28
Cinética de crecimiento de un solo ciclo	28
Inhibición de la activación de caspasas por ZVAD	28
Efecto de la tripsina sobre el procesamiento de VA1	28

Diseño de oligonucleótidos	29
Extracción de RNA.....	30
Síntesis de cDNA.....	30
RT-PCR	31
Corte con las enzimas BamHI y XhoI	31
Ligación de los insertos y el vector	31
Transformación de bacterias JM101 quimiocompetentes	32
PCR en colonia	32
Inducción y enriquecimiento de las proteínas a inmunizar	32
Inmunización de conejos	33
RESULTADOS	34
El astrovirus VA1 puede crecer en diferentes medios, con o sin suero, sin afectar el procesamiento de las proteínas de la cápside y su título viral.....	34
La curva de crecimiento de un solo ciclo del astrovirus VA1 es similar a la de los astrovirus clásicos en la línea celular Caco-2, sin embargo, se encuentra retrasada en las etapas tempranas de la infección.....	39
Las caspasas y la tripsina no están involucradas en el procesamiento de las proteínas de cápside del astrovirus VA1.	41
Producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra diferentes partes de la proteína precursora de la cápside viral para analizar su procesamiento.	44
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS.....	57
REFERENCIAS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae.....	10
Figura 2. Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae incluyendo las nuevas especies descubiertas	12
Figura 3. Organización del genoma de los astrovirus clásicos.....	15
Figura 4. Crío-microscopía electrónica y estructura cristalográfica de la cápside de HAstV	17
Figura 5. Ciclo de replicación de los astrovirus clásicos.....	19
Figura 6. Procesamiento putativo de las proteínas no estructurales expresadas en el ORF1a y ORF1b	20
Figura 7. Esquema del procesamiento proteolítico de la poliproteína VP90 en los astrovirus clásicos.....	23
Figura 8. Construcciones pGEX-4T1-VA1 y mecanismo de inducción mediado por IPTG30	
Figura 9. Esquema de inmunización utilizado para la producción de anticuerpos en conejos	33
Figura 10. Ensayo de inmunoperoxidasa de células Caco-2 infectadas con astrovirus VA1	35
Figura 11. Curva de crecimiento total de VA1 en presencia y ausencia de suero bovino fetal al 10% en células Caco-2.....	36
Figura 12. Western blot de las proteínas virales sintetizadas a diferentes tiempos durante la curva de crecimiento de VA1 en presencia (A) y ausencia (B) de suero bovino fetal.....	37
Figura 13. Efecto de diferentes medios +/- 10% de suero bovino fetal en el crecimiento de VA1	38
Figura 14. Curva de crecimiento de VA1 en ausencia de suero bovino fetal en células Caco-2	39
Figura 15. Proteínas del virus VA1 sintetizadas en ausencia de suero bovino fetal en células Caco-2, detectadas en las células y en el medio extracelular	40
Figura 16. Efecto del inhibidor de caspasas ZVAD sobre el procesamiento de VA1.....	41
Figura 17. Efecto de la tripsina sobre el procesamiento de VA1 y su progenie viral	43
Figura 18. Efecto de la tripsina sobre el procesamiento de VA1 y su progenie viral	43
Figura 19. Esquema del ORF2 del astrovirus clásico Yuc-8 y el astrovirus VA1	45

Figura 20. Construcciones VA1-pGEX-4T1	45
Figura 21. Gel de poliacrilamida de las proteínas de fusión en ausencia y presencia del inductor IPTG	46
Figura 22. Gel de poliacrilamida de las proteínas de fusión después del protocolo de enriquecimiento	47
Figura 23. Geles de poliacrilamida preparativo de las proteínas de fusión de los cuales se cortaron para la producción de sueros hiperinmunes en conejos	47
Figura 24. Western blot utilizando el anticuerpo DB y un lisado de células infectadas o no infectadas y virus purificado.....	48
Figura 25. Western blot utilizando anticuerpo α -core en lisado celular infectado, virus purificado y lisado celular no infectado	49
Figura 26. Western blot utilizando anticuerpo DB en lisado celular infectado.....	50
Figura 27. Esquema del ORF2 del astrovirus VA1	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos sintetizados para la amplificación de las regiones de interés del ORF2 del genoma de VA1	29
Tabla 2. Programa de PCR utilizado para la amplificación de los insertos.....	31

RESUMEN

Los astrovirus son uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis virales en niños, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos, a nivel mundial. Se clasifican en 8 serotipos clásicos que infectan humanos, designados del 1 al 8. En los últimos años se han identificado en humanos 3 nuevas especies de astrovirus que están genéticamente más relacionados con astrovirus aislados de animales que con los serotipos clásicos de humanos. Estos nuevos astrovirus se han encontrados en pacientes inmunosuprimidos con encefalitis, en particular la cepa de astrovirus VA1, la cual se describe en la literatura como neurotrópica.

Recientemente se describió la adaptación de esta cepa de astrovirus VA1 a crecer en cultivo celular, lo que representó un primer paso importante para poder estudiar su biología, sin embargo, para caracterizar aspectos fundamentales de su ciclo de replicación es necesario poder crecer al virus eficientemente. Por esta razón, el primer objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones para que esto sucediera, en la línea celular Caco-2, derivada de células intestinales humanas. En este sentido, definimos que se pueden alcanzar títulos de al menos 1×10^7 partículas virales infecciosas/ml cuando el virus se propaga en el medio mínimo de crecimiento de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con alta glucosa (DMEM HG) en ausencia de suero bovino fetal, infectando las células con una multiplicidad de infección baja (0.01) e incubando las células infectadas por 7 días a 37°C.

Los astrovirus clásicos son cortados proteolíticamente por caspasas intracelulares para procesar la proteína de la cápside de VP90 kDa a VP70 kDa y así poder salir de la célula, por lo que se decidió probar si el astrovirus VA1 también requería ser procesado por caspasas. Para esto, se infectaron células y se incubaron junto con el inhibidor de caspasas ZVAD. Se encontró que el virus VA1 no es procesado por caspasas como los astrovirus clásicos y su título viral tampoco cambia. Además del corte proteolítico por caspasas, los astrovirus clásicos requieren ser tratados con tripsina exógena en cultivo para activar su infectividad, lo que causa el procesamiento proteolítico de la proteína precursora de la cápside, de 70 kDa, para dar un virión maduro, infeccioso formado por dos polipéptidos de 27 y 34 kDa. En el caso de VA1 se ha descrito que la proteína precursora del virus no requiere ser procesada por tripsina para que su infectividad se active, esto fue confirmado al agregar diferentes

concentraciones de tripsina en muestras de virus purificado y observar que la proteasa no tuvo ningún efecto sobre las proteínas virales que forman la partícula infecciosa y el título viral no cambió. Por otro lado, no se ha caracterizado si la infectividad del virus depende del procesamiento con alguna otra proteasa. Para contestar esta pregunta, sintetizamos en *E. coli* 3 regiones diferentes de la proteína precursora de la cápside, e indujimos la producción de anticuerpos en conejo contra ellas. Estos anticuerpos permitieron definir, por ensayo de inmunoblot de células infectadas o no con VA1, así como mediante el análisis de virus purificado, que la proteína precursora de la cápside, a pesar de no requerir tripsina, sí se procesa proteolíticamente de manera intracelular en diversos sitios para dar el virión maduro compuesto de dos polipéptidos de 34 y 38 kDa. Demostramos que estos polipéptidos corresponden al “core” y a la espícula, respectivamente, de la estructura conocida para los astrovirus clásicos de humano. Pretendemos continuar con este trabajo para determinar la clase de proteasa que lleva a cabo el corte proteolítico de la proteína precursora de la cápside de VA1, y si este corte es importante para la infectividad.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de los astrovirus

Los virus son parásitos intracelulares obligados capaces de producir enfermedades infecciosas. Los virus pertenecientes a la familia *Astroviridae* (derivado de la palabra griega “astron”, por su forma de estrella) se caracterizan por ser virus no envueltos con simetría icosaédrica, de un tamaño aproximado de 41nm; no poseen envoltura lipídica y su genoma es de una sola cadena de RNA de sentido positivo

La familia *Astroviridae* tiene dos géneros (Figura 1): *Avastrovirus* y *Mamastrovirus*. Los virus en el género *Avastrovirus* se caracterizan por infectar especies de aves como patos, pavos y gallinas, y causa patologías como enteritis, hepatitis y nefritis; por otro lado, los virus del género *Mamastrovirus* infectan diferentes especies de mamíferos, incluyendo humanos, ovinos, bovinos, visones, cerdos, gatos, perros y ratones, y causa patologías entéricas.

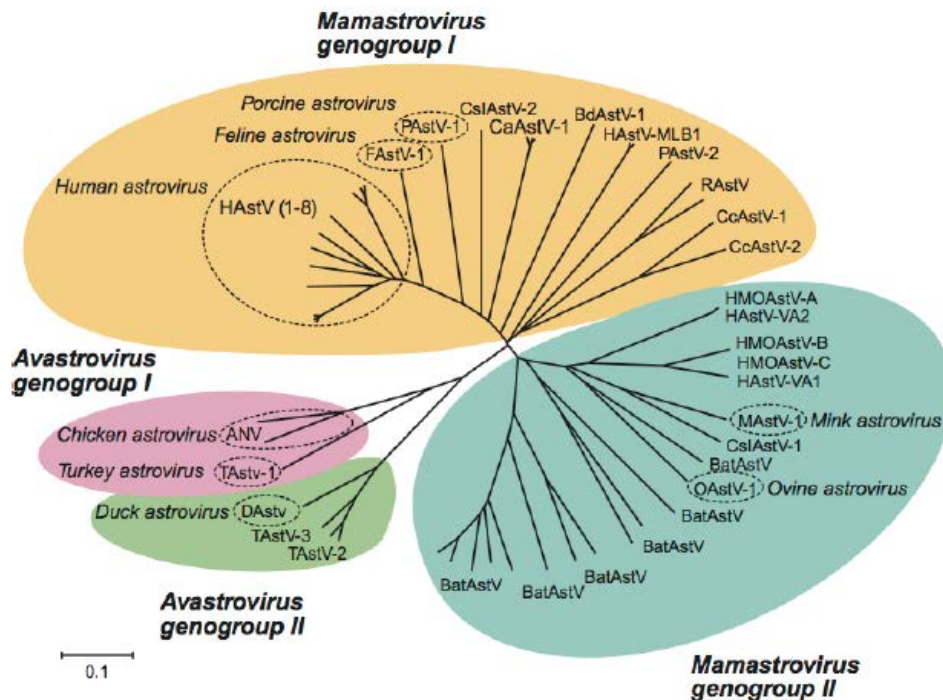


Figura 1. Relaciones filogenéticas dentro de la familia *Astroviridae*. Presenta dos géneros: *Avastrovirus* y *Mamastrovirus*. La clasificación de las especies está basada en la secuencia de aminoácidos del ORF2 (Méndez and Arias, 2013).

Astrovirus que infectan humanos

Los astrovirus fueron descubiertos en 1975, en una muestra fecal de niños con diarrea y vomito analizada por microscopía electrónica (Appleton and Higgins 1975); desde entonces, estos virus han sido reconocidos como un agente causante de gastroenteritis a nivel mundial, provocando del 2-9% de las gastroenteritis no bacterianas (Bosch, Pintó, and Guix 2014). Los astrovirus son transmitidos por la vía fecal-oral y afectan principalmente a niños en los primeros años de vida, a personas mayores y a personas inmunocomprometidas (Kurtz et al. 1979). Recientemente se han observado casos de encefalitis asociados con astrovirus en pacientes inmunocomprometidos (Reuter, Pankovics, and Boros 2018).

La especie *Mamastrovirus 1* (MAstV 1) incluye a los astrovirus clásicos que infectan humanos. Estos astrovirus se han aislado a partir de muestras fecales y comprenden los serotipos del 1 al 8 (HAstVs 1 al 8). HAstV-1 parece ser el genotipo circulante predominante en todo el mundo, representando el 50% de casos en los reportes recientes, mientras que el segundo más frecuente difiere según la región geográfica caracterizada (Vu et al. 2017).

Desde el año 2008 se han identificado, por medio de secuenciación de próxima generación (NGS), tres especies adicionales de astrovirus que infectan humanos (MAstV 6, 8 y 9). MAstVs 6 incluye al clado MLB1, MLB2 y MLB3 (“MLB” quiere decir Melbourne, el lugar de donde se obtuvieron las primeras muestras). MAstVs 8 incluye al clado VA2 y VA4 (“VA” quiere decir Virginia); a este clado también se le conoce como HMO-A (Human-Mink-Ovine-like-Astrovirus). Finalmente, MAstVs 9 incluye al clado VA1 (o HMO-C) y VA3 (HMO-B) (Figura 2). Los nuevos astrovirus han sido estudiados en todo el mundo sin ninguna clara distinción sobre su seroprevalencia entre países en desarrollo e industrializados. Estudios serológicos en EUA han reportado una alta seroprevalencia en adultos de HAstV-MLB1 y HAstV-VA1 (HMO-C) (86% y 65%, respectivamente) (Burbelo et al. 2011; Holtz et al. 2014). Es importante mencionar que los nuevos astrovirus identificados están más cercanos filogenéticamente a astrovirus de origen animal que a los astrovirus de humanos clásicos (Figura 2).

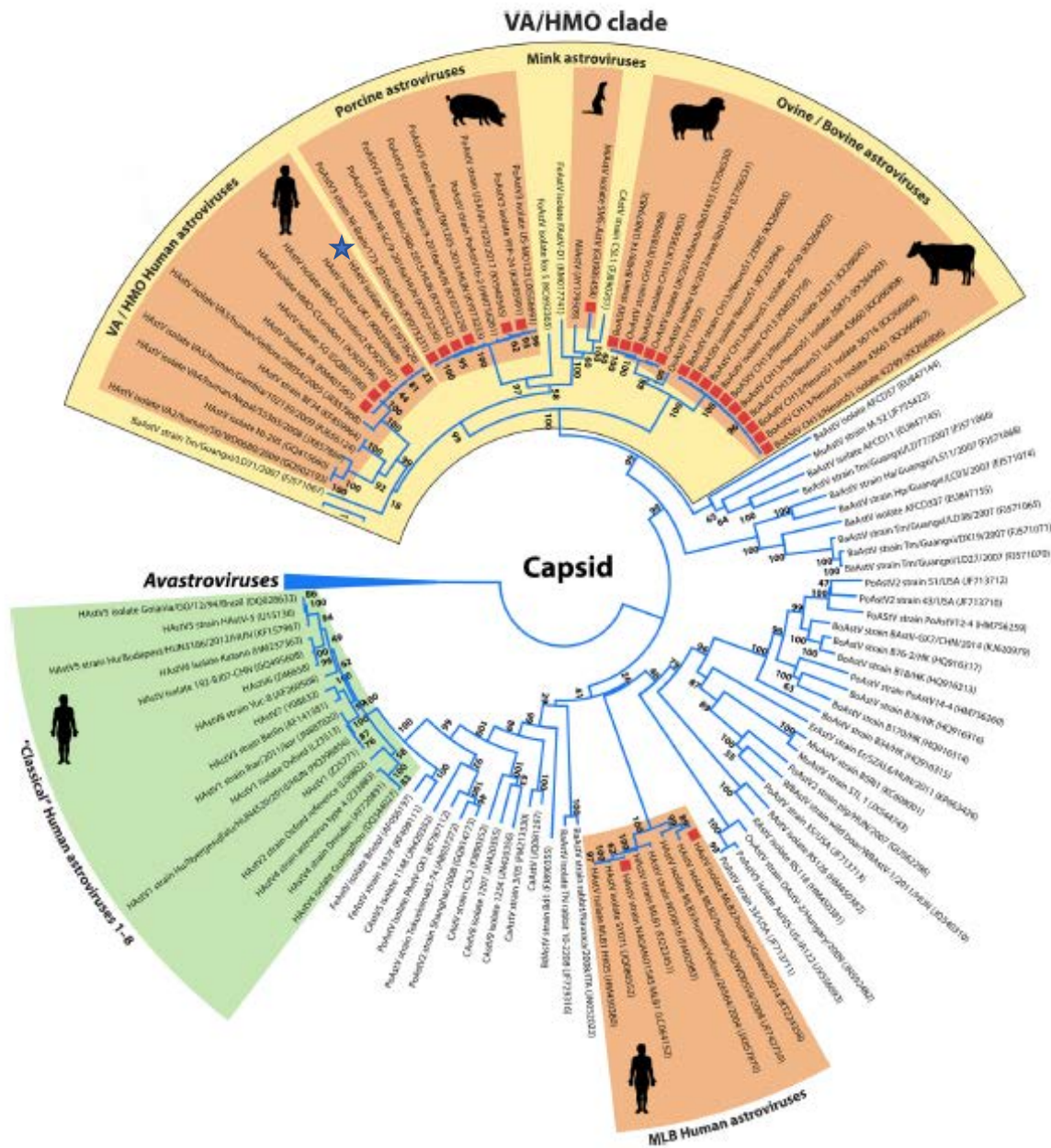


Figura 2. Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae incluyendo las nuevas especies descubiertas. Se describen virus pertenecientes a los dos géneros: *Avastrovirus* y *Mamastrovirus*. Los virus marcados con un cuadro rojo indican los nuevos serotipos descubiertos. La estrella azul represent la cepa HAsV-VA1. La clasificación de las especies está basada en la secuencia de aminoácidos del ORF2 (Reuter, Pankovics, and Boros 2018).

Asociación de los nuevos astrovirus de humano con enfermedades neurológicas

El astrovirus VA1 es el que se ha encontrado más frecuentemente asociado a problemas de encefalitis y meningitis. Este virus se describió originalmente en 2009, en un brote de gastroenteritis en una guardería de niños en Virginia, EUA (Ruone et al. 2009). Posterior a su descripción se reportó su presencia en un niño de 15 años con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, quien fue admitido al hospital debido a un deterioro cognitivo progresivo. Entró en coma 4 semanas después de su admisión al hospital y murió 71 días después de la admisión. Durante su hospitalización no se pudieron encontrar en líquido cefalorraquídeo ni bacterias ni virus conocidos. Por NGS de una muestra de biopsia de la corteza frontal se encontró una secuencia genómica de 6584 pb, con homología de secuencia a la de los astrovirus clásicos y muy similar a la primera secuencia reportada de VA1 (Quan et al. 2010).

En otro caso, publicado en 2015, un niño de 18 meses con inmunodeficiencia se sometió a un trasplante de células madre de sangre de un donador. Dos semanas después, el niño mostró malestar con irritabilidad, distonía y conciencia reducida, asociada con encefalopatía. Se realizaron pruebas para descartar los agentes etiológicos comunes sin obtenerse resultados positivos. El paciente falleció 9 meses después del trasplante debido al deterioro neurológico y complicaciones gastrointestinales y respiratorias. Se llevó a cabo el análisis de una biopsia de cerebro por NGS, detectando el genoma del astrovirus VA1 (Brown et al. 2015).

En un tercer caso, un hombre de 42 años con leucemia linfocítica crónica se sometió a un trasplante alogénico de médula ósea en 2013, a raíz de esto se le detectó linfopenia y desarrolló una sordera definitiva y posteriormente disnea, náusea, poco balance, irritabilidad y agotamiento. No se detectaron enterovirus ni herpesvirus. En una biopsia del lóbulo frontal, analizada por NGS se encontró el astrovirus VA1 y el paciente falleció posteriormente (Naccache et al. 2015).

El genoma de VA1 se encontró también en una muestra del lóbulo frontal en un niño de 15 años con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X que fue admitido al hospital debido a una disminución cognitiva y convulsiones (Frémond et al. 2015). En un quinto reporte, una

niña de 4 meses con leucemia mieloide aguda se sometió a un trasplante de médula espinal. El paciente desarrollo encefalopatía y falleció. Una biopsia post-mortem del cerebro analizada por NGS y por RT-PCR mostró también la presencia de secuencias de astrovirus VA1 (Lum et al. 2016).

Organización del genoma de los astrovirus

El genoma de los astrovirus contiene un segmento de RNA de sentido positivo de una sola cadena de aproximadamente 6.2 a 7.7 kb. No tiene una estructura de cap en el extremo 5', pero sí una proteína ligada covalentemente a este extremo llamada VPg. En el extremo 3' se encuentra una cola de poli(A). El genoma se divide en tres marcos abiertos de lectura (ORF) superpuestos, denominados ORF1a, ORF1b y ORF2, que están flanqueados por regiones no traducidas (UTR). Las longitudes de los ORFs son variables, dependiendo de la cepa de astrovirus.

Entre los ORFs 1a y 1b, localizados hacia la región 5' del genoma, se localiza una estructura de tallo-asa (hairpin) que permite que ambos ORFs se traduzcan juntos por un cambio de marco de lectura (frameshift) (Figura 3). Los ORFs 1a y 1b codifican las proteínas no estructurales del virus. El ORF1a produce a la poliproteína nsp1a que incluyen una serin proteasa y la proteína que se une al genoma viral (VPg), por otro lado, el ORF1b produce una RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp). En el extremo 3' del genoma, el ORF2 codifica para los proteínas estructurales de virus, que se sintetizan a partir de un RNA subgenómico (Figura 3).

En el 2019 se encontró a través de un análisis genómico comparativo de más de 400 secuencias de astrovirus un "ORFX" que se sobrelapa con el ORF2. Este ORFX codifica para una proteína funcional denominada XP. Estudios demostraron que esta proteína se asocia con la membrana plasmática con un dominio N-terminal extracelular y promueve la salida eficiente del virus al provocar la permeabilización de la célula, sugiriendo que es un tipo de viroporina, sin embargo, los astrovirus del genogrupo IIa, como el astrovirus VA1 carecen de este ORFX (Lulla and Firth 2019).

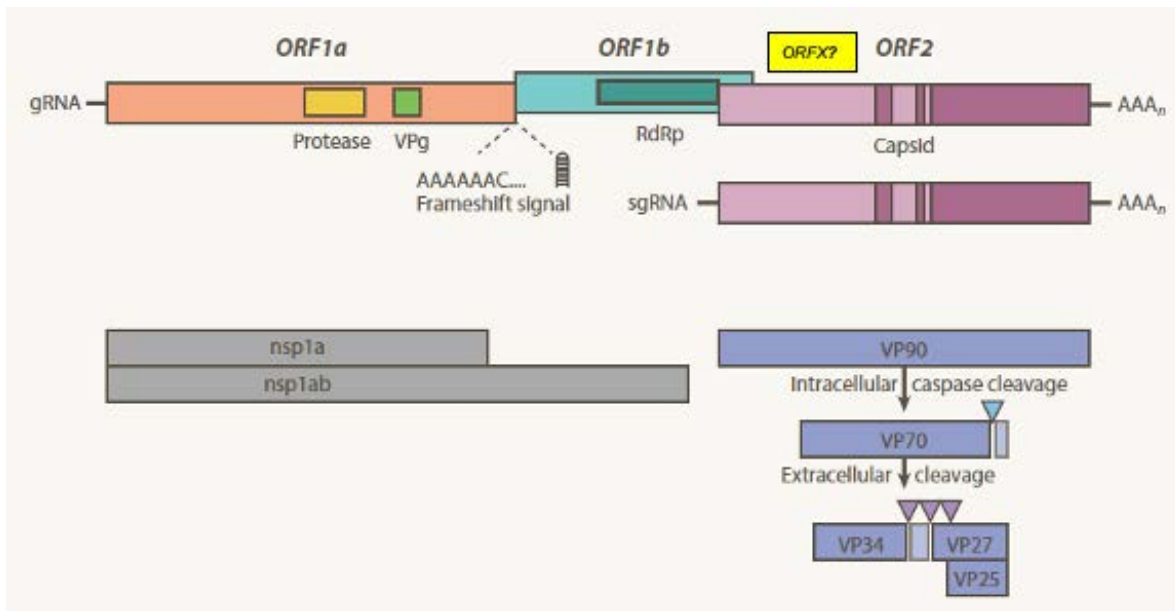


Figura 3. Organización del genoma de los astrovirus clásicos. El genoma consta de tres marcos abiertos de lectura (ORFs) que se sobrelapan. El ORF1a y el ORF1b codifican para proteínas no estructurales y el ORF2 para proteínas estructurales. El ORF1a codifica a la proteína nsp1a, mientras que la proteína nsp1ab es codificada tanto por el ORF1a como por el ORF1b debido a un cambio en el marco de lectura. La proteína de la cápside (VP90), codificada en el ORF2 presente en el RNA subgenómico, se procesa proteolíticamente por caspasas intracelulares que originan una partícula de 70 kDa (VP70) y posteriormente es procesada por tripsina extracelular hasta formar el virión maduro infeccioso conformado de VP34 y VP27. El ORFX que se sobrelapa con el ORF2 codifica para la proteína XP que actúa como una viroporina en los astrovirus clásicos (Cortez et al. 2017).

Estructura del virus

En los últimos años se ha podido determinar la estructura de los HAstV clásicos mediante crió-microscopía electrónica y también la estructura de las proteínas de la cápside por cristalografía de alta resolución (Figura 4) (Bass and Qiu 2000; Dong et al. 2011; Dryden et al. 2012; Mendez-Toss et al. 2000; Toh et al. 2016).

La estructura de los viriones inmaduros (formados por la proteína VP70) y maduros (formados por las proteínas VP34, VP27 y VP25) se ha determinado a una resolución de 25 Å por crió-microscopía electrónica. Esta técnica ha permitido determinar que el dominio del core de HAstV forma una estructura icosaédrica de simetría T=3. La partícula inmadura se compone de 90 espículas díméricas, mientras que la partícula madura solo tiene 30. Se observó también que las partículas maduras e inmaduras tienen un diámetro de ~43 nm, de los cuales ~35nm corresponden al core interno (Dryden et al. 2012; York et al. 2016).

Información sobre la estructura de las proteínas de la cápside obtenidas por cristalografía de rayos-x permitió describir con mayor detalle las estructuras del core a 2.15 Å de resolución, respectivamente. La estructura de VP90 se compone de dos dominios: un dominio tipo S, que adopta el dominio de barril β tipo “jelly-roll” y un dominio P1, que forma un barril que consiste de 6 β plegadas antiparalelas. El dominio P1 cambia con la maduración de la partícula viral al ser digerido por tripsina; al final de la proteólisis, los fragmentos que resultan permanecen unidos por el extremo de la cadena β en el dominio del core (Toh et al. 2016).

Las espículas, de 25 y 27 kDa, se localizan en la superficie de la partícula viral en forma de dímero. Cada monomero se conforma por tres capas de láminas β en forma de sándwich; VP27 se encuentra antes del final de la cadena β del dominio de core, lo que probablemente permite a la espícula mantenerse unido al core, en cambio, VP25 inicia luego del dominio del core, mediante una unión flexible, lo que sugiere puede ser liberado del virión o está débilmente asociado a él luego de la digestión con tripsina (Dong et al. 2011; Dryden et al. 2012; Toh et al. 2016; York et al. 2016). Recientemente se reportó que los viriones infecciosos de HAstV-8 están formados por sólo dos proteínas: VP34 que forma el core y VP27 las espículas globulares del virus (Aguilar-Hernández, López, and Arias 2018).

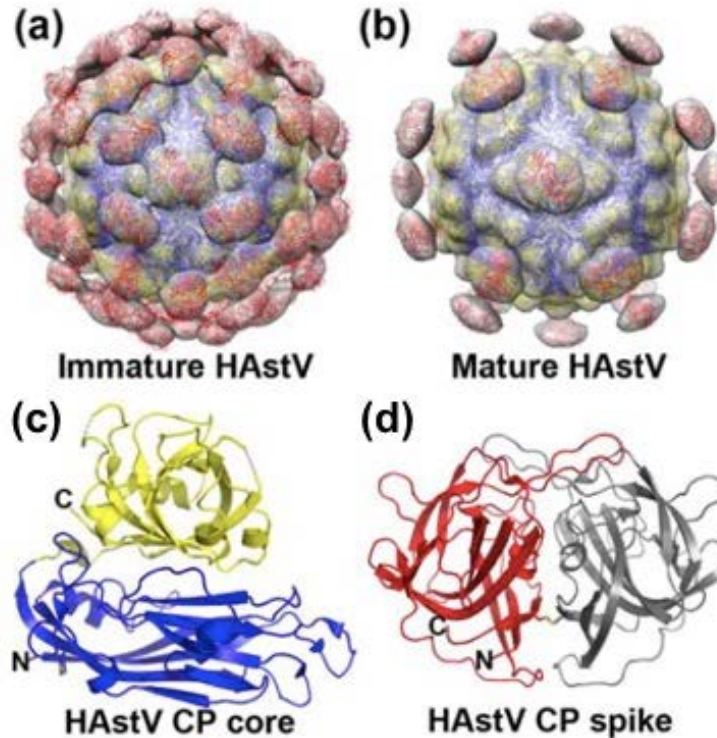


Figura 4. Crío-microscopía electrónica y estructura cristalográfica de la cápside de HAstV. a) modelo del virión inmaduro T=3 obtenido por crío-microscopía electrónica; b) modelo del virión maduro T=3 digerido con tripsina obtenido por crío-microscopía electrónica; c) estructura cristalográfica del dominio del core de HAstV-1, en amarillo el core externo (P1) y azul el interno (S); d) estructura cristalográfica de la espícula dimérica (Arias and Dubois 2017).

Ciclo de replicación

Entrada y unión

El ciclo de replicación del virus aún no se conoce en su totalidad (Figura 5), aunque hay diversas etapas que ya han sido más caracterizadas. La replicación comienza con la unión del virus al receptor de la célula. El receptor o receptores celulares para los diferentes astrovirus aún no se conocen. La estructura cristalográfica de las espículas que se proyectan de la superficie del virus en el caso de los astrovirus clásicos, mostró una región de residuos de aminoácidos polares conservada, característica de sitios de unión a oligosacáridos, sin embargo, ha pesar de que se han probado diversos polisacáridos como heparina, heparán sulfato y dextransulfato para bloquear la infectividad de HAstV-8, sólo se ha podido observar un bloqueo parcial de su infectividad (Toh et al. 2016).

En el caso del astrovirus cásico Yuc-8 (HAstV-8), el tiempo promedio para su unión a la superficie celular es de 10 min. Este virus se internaliza por vía endocítica mediada por clatrina, ya que se ha observado que al disminuir la expresión de la cadena pesada de clatrina, mediante el sistema de interferencia de RNA (iRNA) y sobre-expresando mutantes dominantes negativos de dinamina 2 (GTPasa que está involucrada en la escisión de los endosomas de la membrana celular) y Eps15 (adaptador de proteínas que interactúan con clatrina durante la endocitosis) se observa una disminución en la replicación del virus HAstV-8 (Mendez et al. 2014).

Una vez que el virus entra en la célula, el RNA genómico es liberado al citoplasma. Se ha estimado que el tiempo medio de liberación del RNA genómico es de 130 min, sin embargo, no se conoce el sitio ni los factores virales o celulares implicados. Al silenciar mediante iRNA la expresión de Rab7, la cual es una GTPasa involucrada en el proceso del tráfico vesicular (incluyendo la maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos), la infectividad del virus disminuyó un 50%, lo que sugiere que el virus debe llegar al endosoma tardío para liberar sus genomas (Mendez et al. 2014).

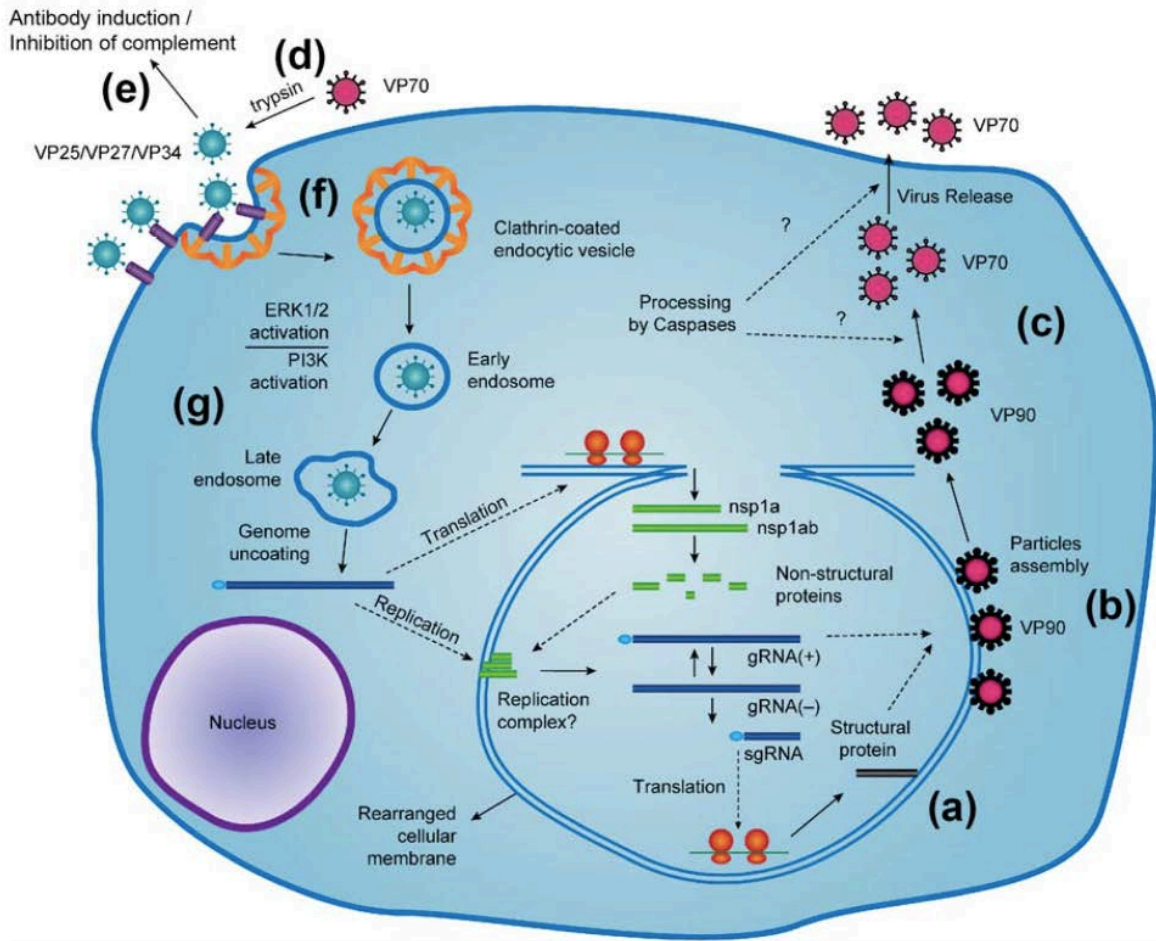


Figura 5. Ciclo de replicación de los astrovirus clásicos. a) Síntesis de la poliproteína de la cápside VP90, de 90 kDa, a partir del RNA subgenómico (sgRNA), b) Ensamble de las proteínas VP90 (180 copias) con el genoma viral de RNA en partículas de HAstV, c) Corte de la proteína VP90 mediado por caspasas para formar VP70 y de manera posterior, la liberación de las partículas de HAstV inmaduras, d) Corte realizado por una proteasa extracelular (*in vitro* se utiliza tripsina) para producir partículas infecciosas de HAstV maduras conformadas por VP34, VP27 y VP25, e) Las partículas extracelulares de HAstV inducen la producción de anticuerpos e inhiben la activación por complementación del huésped, f) Unión y endocitosis mediada por clatrina de las partículas de HAstV, g) Liberación del genoma del virus en el endosoma tardío. La replicación del virus ocurre asociada a membranas (Arias and Dubois 2017).

Traducción y replicación del genoma

Una vez en el citoplasma, el RNA genómico es utilizado como templado para traducir las poliproteínas no estructurales nsp1a y nsp1ab. La proteína nsp1a es codificada por el ORF1a, mientras que la proteína nsp1ab es codificada por el ORF1a y el ORF1b por medio de un mecanismo de cambio de lectura. Se han sugerido al menos 4 sitios de corte para la

poliproteína nsP1a, lo que puede generar 4 posibles productos nsP1a/1, nsP1a/2, nsP1a/3 y nsP1a/4 (Figura 6). La proteína nsP1a/3 codifica para una serin proteasa; ensayos de actividad hidrolítica indican que reconoce los residuos de aminoácidos Glu y Asp como sustrato de corte. Por otro lado, nsP1a/4 co-localiza con el retículo endoplásmico y el RNA viral y tiene descrito varios dominios: un dominio de muerte (DD), uno de localización nuclear (NLS), uno que codifica para la proteína viral ligada al genoma (Vpg) y una región hipervariable (HVR), así como un posible dominio putativo de helicasa (HEL). Se indentificó una proteína ligada al genoma viral (VPg) unida covalentemente al extremo 5' terminal del genoma, a través de un enlace fosfodiester, que es esencial para la infectividad del virus ya que una mutación puntual en esta región inhibe la replicación del virus (Fuentes et al. 2012). La función de los otros productos de corte de nsP1a no han sido caracterizados.

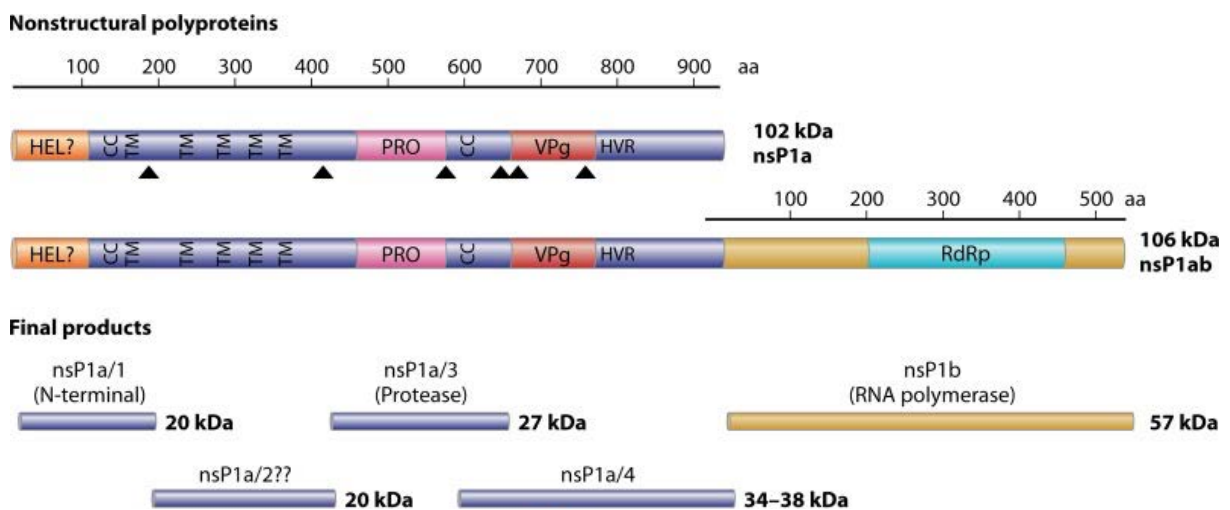


Figura 6. Procesamiento putativo de las proteínas no estructurales expresadas en el ORF1a y ORF1b. HEL, dominio putativo de helicasa; CC, dominio de coiled-coil; TM, dominios transmembranales; PRO, dominio de proteasa, VPG, proteína viral unida al genoma; HVR, región hipervariable; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA, P, fosforilación post-traduccion. Triángulos muestran posibles sitio de corte proteolítico. Modificado de (Bosch, Pintó, and Guix 2014).

La traducción de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) ocurre a través de un mecanismo de cambio de marco ribosomal -1 (frameshift) en la región sobrelapada entre el ORF1a y el ORF1b. Esta señal está dada por una secuencia heptamérica (A₆C) y una

estructura de tallo-asa, las cuales están conservadas en los astrovirus clásicos y los nuevos astrovirus (Brierley and Vidakovic 2003; Lewis and Matsui 1995). La proteína obtenida, nsp1ab, es procesada co-traduccionalmente en el amino terminal por una posible proteasa celular para formar la proteína nsp1b (Mendez et al. 2003).

Una vez sintetizadas las proteínas no estructurales del virus, éstas funcionan para replicar el RNA viral. El proceso de replicación no ha sido caracterizado en detalle pero se puede inferir a partir de otros virus con cadena sencilla de RNA de polaridad positiva. En consecuencia, inicialmente se sintetiza una copia completa del RNA genómico (RNAg), que se conoce como RNA antígenómico (RNAag) de polaridad negativa. Este RNAag se utiliza a la vez como molde para la producción de dos formas de RNA de polaridad positiva, una correspondiente al RNAg genómico y otra al RNA sub-genómico (RNAsg). Este RNAsg sirve como RNAm para dirigir la síntesis de las proteínas estructurales del virus. Aún se desconocen otros aspectos del proceso de replicación, como cuál es el papel que juega la proteína VPg en la traducción y replicación del RNAg, así como el mecanismo que utiliza el virus para cambiar de del modo “replicación” (síntesis del RNAag) al modo “transcripción” (síntesis del RNAg) (Bosch, Pintó, and Guix 2014). Existen algunos ejemplos de proteínas celulares que interactúan con el RNA viral; se ha observado que al utilizar iRNA contra genes involucrados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos, al igual que de fosfatidilinositol e inositol fosfato disminuyen las cantidades de RNA genómico en Yuc8, sin embargo, aún se desconocen otras proteínas con las cual podría haber interacción (Méndez et al. 2013).

Ensamble y salida

Las proteínas estructurales se sintetizan a partir del RNA sub-genómico como una poliproteína de 90 kDa (VP90), posiblemente a través de un mecanismo que involucre la presencia de VPg en el extremo 5' del RNAsg (Fuentes et al. 2012). El extremo N-terminal de VP90 es más conservado que el extremo C-terminal, el cual es hipervariable. El modelo de morfogénesis de los astrovirus clásicos sugiere que la poliproteína VP90 se ensambla en 180 copias formando viriones inmaduros (Mendez, Salas-Ocampo, and Arias 2004) y que las caspasas 3 y 9 cortan la poliproteína VP90 cerca del extremo C-terminal, resultando en cápsides virales de 70 kDa (VP70) (Banos-Lara and Méndez 2010) (Figura 7). El procesamiento de VP90 a VP70 no es requerido para el ensamble de las partículas, sin embargo, es importante para que el virus pueda salir de la célula infectada; la inhibición de la actividad de caspasas reduce drásticamente la liberación de las partículas virales (Banos-Lara and Méndez 2010; Mendez, Salas-Ocampo, and Arias 2004).

El mecanismo por el cual se liberan las partículas virales inmaduras no se conoce. Se sugiere que ocurre por un mecanismo no-lítico, a través de vesículas autofágicas o de alguna forma de desestabilización de la membrana celular como sería el caso de la proteína XP que actúa como una viroporina (Arias and Dubois 2017; Lulla and Firth 2019). Una vez fuera de la célula, las partículas inmaduras conformadas por VP70 son procesadas por proteasas extracelulares para producir partículas maduras e infecciosas de astrovirus. En cultivo celular, la maduración de las partículas se obtiene por medio de la proteólisis con tripsina, la cual aumenta la infectividad viral hasta 10^5 veces (Mendez et al. 2002). La proteólisis por tripsina resulta en el procesamiento de la poliproteína VP70 para dar finalmente 2 polipéptidos de VP34 y VP27 que constituyen el virión infeccioso maduro (Aguilar-Hernández, López, and Arias 2018). La proteína VP34 es derivada del dominio N-terminal conservado de la poliproteína VP70 y formará la cápside; por otro lado, VP27 proviene de la región hipervariable y forma las espículas de la superficie de la cápside (Mendez et al. 2002).

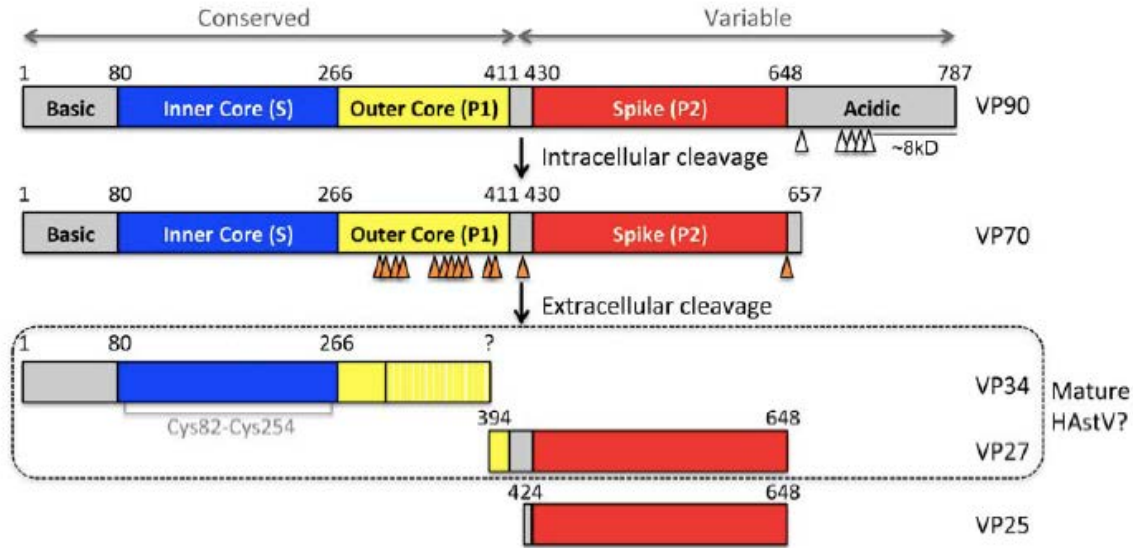


Figura 7. Esquema del procesamiento proteolítico de la poliproteína VP90 en los astrovirus clásicos. La proteína VP90, traducida a partir del RNA subgenómico, es procesada por caspasas intracelulares (flechas blancas) para producir la proteína VP70 y permitir la salida del virus de la célula. La proteína VP70 es procesada por proteasas extracelulares (flechas naranjas), tipo tripsina, para producir a las proteínas que conforman la partícula madura: VP34, VP27 y VP25 (Arias and Dubois 2017). Aunque recientemente se describió que los viriones infecciosos están solamente compuestos por VP34 y VP27 (Aguilar-Hernández, López, and Arias 2018).

ANTECEDENTES

En un brote agudo de gastroenteritis ocurrido en 2009 en una guardería de niños en Virginia, EUA, se analizó una muestra de heces por NGS encontrándose secuencias virales que mostraban poca identidad con los astrovirus clásicos (Ruone et al. 2009). A esta cepa se le llamó VA1. Posteriormente, Janowski y colaboradores reportaron la adaptación del virus, a crecer en la línea celular Caco-2, en la cual se observó un aumento en el número de copias del genoma a lo largo de varios pases. Es importante mencionar que durante los pases, no se observó evidencia de efecto citopático (Janowski et al. 2017).

De particular interés fue la observación de que VA1, a diferencia de los astrovirus clásicos, no requiere ser tratado con tripsina para activar su infectividad y por lo tanto para ser propagado en cultivo celular, ya que el número de copias de RNA en células Caco-2 infectadas con el virus tratado y no tratado con tripsina no fue significativamente diferente a lo largo de varios pases. Además, estos autores realizaron una cinética de infección del virus VA1 en las líneas celulares Caco-2, A549, HEK293T y BHK-21 sin la adición de tripsina exógena, en presencia de suero bovino fetal. Se observó un aumento en el número de copias de RNA tanto en el medio extracelular como dentro de las células en las líneas Caco-2, A549 y HEK293T pero no en las BHK-21 (Janowski et al. 2017). Por otro lado, Se evaluó la susceptibilidad de neuronas primarias humanas, astrocitos primarios humanos, y las líneas inmortalizadas de sistema nervioso SK-N-SH, U87 MG y SW-1088 a la infección y replicación del virus VA1. Los astrocitos primarios y la línea neural SK-N-SH permitieron la replicación del virus ya que se observó un aumento en el número de copias de RNA. Este crecimiento tampoco dependió del tratamiento del virus con tripsina (Janowski and Klein 2019).

De interés, a pesar de que el virus no requiere ser tratado con tripsina para ser infeccioso, existe la posibilidad de que la proteína de cápside de astrovirus sí sufra un procesamiento proteolítico durante el ciclo de vida del virus. Es importante enfatizar que para poder estudiar aspectos fundamentales de la biología del virus es necesario poder crecerlo de manera eficiente en células en cultivo, lo cual hasta ahora no se ha reportado.

HIPÓTESIS

La curva de crecimiento de un solo ciclo del astrovirus neurotrópico VA1 será similar a la de los astrovirus clásicos y podremos obtener lisados de células infectadas que tengan un alto título de virus infeccioso. Hipotetizamos también, que la proteína de cápside se procesará proteolíticamente en algún momento del ciclo de replicación del virus.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el crecimiento del astrovirus VA1 en células epiteliales intestinales y el procesamiento de la proteína de la cápside.

Objetivos particulares

- Definir las condiciones para producir un lisado viral con alto título infeccioso.
- Determinar si la presencia de suero bovino fetal influye en el crecimiento del virus y procesamiento de su cápside.
- Caracterizar la curva de crecimiento de un solo ciclo de VA1.
- Explorar si las proteasas que procesan a los astrovirus clásicos (caspasas y tripsina) son necesarias para el ciclo de replicación del astrovirus VA1.
- Caracterizar el procesamiento del precursor de la proteína de cápside del astrovirus VA1.

METODOLOGÍA

Células y virus

La línea celular Caco-2 (células de adenocarcinoma colorectal humano), clona de C2Bbe, se creció bajo una atmósfera de 10% de CO₂, a 37°C, en medio DMEM Advanced (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y 2mM de glutamina.

La cepa de astrovirus serotipo 8 (HAstV-8/Yuc-8) se propagó en células Caco-2, previa activación con 200 µg/ml de tripsina a 37°C por 60 min en ambiente con 5% de CO₂.

La cepa de astrovirus VA-1 (VA-1/HMO-C) se propagó en células Caco-2. Se infectaron células Caco-2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01 a 0.001 y se incubó a 37°C durante 2 horas con una atmósfera de 10% de CO₂ para permitir la adsorción. De manera posterior, se dejó el inoculó y se adicionó DMEM HG y se dejó incubando bajo una atmósfera de 10% CO₂ durante 7 días. Las células se congelaron y descongelaron tres veces, y el lisado de las células infectadas se almacenó a -70°C, para posteriormente determinar el título viral en el lisado celular.

Determinación del título de virus infeccioso

El título viral se determinó por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa, según lo descrito por Méndez y colaboradores (Mendez et al. 2002). De manera breve, se crecieron células Caco-2 en cajas de 96 pozos hasta que se formó una monocapa confluyente (4.5×10^4 células). La monocapa se lavó 2 veces con MEM y se infectó como se describió para la propagación del virus, realizando diluciones seriadas del lisado de interés. Se incubó durante 48 h a 37°C en un ambiente con 10% de CO₂, posteriormente se lavó la monocapa con 100 µl de PBS 1x y se fijó con una solución de formaldehído al 2.5% durante 20 min a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS 1x. Después, la membrana de las células se permeabilizó con una solución de Tritón X-100 (Sigma) al 0.2% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó la monocapa 3 veces con PBS 1x y se añadió el anticuerpo primario policlonal producido en conejo contra el core del astrovirus VA-1 (DB diluido 1:200) o bien contra el core del astrovirus Yuc-8 (α -Yuc8, diluido 1:2000). Posteriormente se añadió la proteína A acoplada a peroxidasa, diluido 1:3000 para detectar el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se incubó a 4°C toda la noche y el secundario 1 h a 37°C, ambos se

lavaron tres veces con PBS 1x. Por último, se adicionó el sustrato de peroxidasa (carbazol: 5 ml de buffer de acetatos 0.5 N, 1.5 ml de carbazol y 10 µl de agua oxigenada), se lavó con agua una vez que se observó coloración en las células y se contaron las unidades formadoras de focos (uff/ml) a un aumento de 20 x en un microscopio invertido (Nikon, Japón).

Western blot

La muestra de interés se mezcló con amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% de azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol); después las muestras se hirvieron por 5 min y se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE al 10%.

Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 130 mA por 1 h. Posteriormente, la membrana se bloqueó durante 1 h con leche descremada (Carnation) al 5% en PBS-Tween al 0.1%. La membrana se incubó con el anticuerpo primario policlonal (DB 1:1000, α-core 1:1000) diluido en leche descremada al 1% en PBS-Tween al 0.1%, durante toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.1% durante 10 min cada lavado y se añadió el anticuerpo secundario (α-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, diluido 1:3000) 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la membrana 5 veces con PBS-Tween al 0.1% durante 10 min cada lavado. Se detectaron las proteínas utilizando el sistema Western Lightning (Perkin Elmer) (Waltham, Usa) exponiéndose una película hipersensible Kodak (Rochester, USA).

Purificación de partículas virales

Se infectaron monocapas confluentes de Caco-2 en frascos con 9.4×10^6 células con una MOI de 5 con el astrovirus VA1 durante 48 h a 37°C. Se despegó por raspado la monocapa de células infectadas y se lisaron congelando y descongelando 3 veces. Antes del proceso de purificación del lisado de células infectadas se trató con 1% Tritón-X-100 por 60 min a temperatura ambiente, se centrifugó el lisado a 2000 x g por 10 min, y el sobrenadante obtenido se filtró por una membrana con poros de 45 µm (Corning). Una vez filtrados, los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 50,000 x g por 16 h a 4°C en el rotor SW55Ti (Beckman Coulter) usando tubos de polipropileno (Beckman Coulter) para sedimentar el virus. El botón sedimentado se resuspendió en 4 ml de buffer TNE (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.1 M, EDTA 10 mM). Esta suspensión se ajustó a 0.5% v/v con el detergente octil glucósido y se incubó por 30 min a 4°C para liberar el virus asociado a membranas. Finalmente, se ultracentrifugó

una vez más 200,000 x g por 2 h en el rotor SW55Ti a través de un colchón de sacarosa al 30% en TNE para sedimentar el virus. El virus purificado se resuspendió en 150 µl de TNE y se guardó a -70°C.

Evaluación de la producción de proteína y título viral en varios medios

Se infectaron células Caco-2 en una placa de 48 pozos con VA1 a una MOI de 3. El virus se adsorbió durante 2 h y después se lavó dos veces con MEM y se agregaron los medios a probar (MEM +/- SFB, DMEM HG +/- SFB, DMEM Adv +/-SFB). Las células se incubaron durante 48 h y finalmente se lavó la monocapa 2 veces y se cosechó. Se determinó el título viral de cada tiempo por medio del ensayo de inmunoperoxidasa y la producción de proteína viral se caracterizó por medio de Western blot.

Cinética de crecimiento de un solo ciclo

En una placa de 48 pozos se infectó una monocapa de células Caco-2 con VA1 a una MOI de 5, se adsorbió durante 2 h y a diferentes h post-infección (hpi) (0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 h) se retiró el sobrenadante y se cosecharon las células. Las células y sobrenadante, por separado, se congelaron y descongelaron 3 veces y se determinó el título viral de cada tiempo por medio del ensayo de inmunoperoxidasa, y la producción de proteína viral se caracterizó por medio de Western blot.

Inhibición de la activación de caspasas por ZVAD

Se crecieron células Caco-2 en una placa de 48 pozos y se infectaron con una MOI de 3 con VA1 o Yuc-8. El virus se adsorbió durante 2 h y después se lavó dos veces con MEM y se agregó DMEM HG con ZVAD 50µM y DMEM HG con DMSO como control. Las células se incubaron durante 48 h y finalmente se congelaron y descongelaron 3 veces. Se determinó la producción de proteína viral por medio de Western blot para ambos virus.

Efecto de la tripsina sobre el procesamiento de VA1

Se tomó sobrenadante del virus purificado, además del virus purificado, y se agregaron 10, 20, 50, 100 y 200 µg/ml de tripsina. Se incubó durante 1 h a 37°C y se agregó la misma concentración de inhibidor de tripsina. Finalmente se tomó la mitad del volumen final para observar el procesamiento de las proteínas por Western blot y la otra mitad se utilizó para titular la progenie viral.

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos (Tabla 1) para amplificar por un ensayo de RT-PCR (transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) 3 diferentes regiones del ORF2 del astrovirus VA1 que, en principio, corresponderían al core, la espícula y el extremo carboxilo terminal de la proteína precursora de la cápside. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEX-4T1 (Figura 8). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos sintetizados para la amplificación de las regiones de interés del ORF2 del genoma de VA1. Se muestra el número de aminoácidos del ORF2 abarcados para cada oligonucleotido. En morado está el sitio de corte para la enzima BamHI y en naranja el sitio de corte para el enzima XhoI.

Aminoácidos	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido
180-300	5'CGCGTG↓GATCCaagcagttcacttggaagc 3'	3'GGCTGC↓TCGAGTCAatttggtcctcctcgaacc 5'
490-620	5'CTAATG↓GATCCtggacgctagatggccag 3'	3'GAAGGC↓TCGAGTCAggcaaatccccttg 5'
710-758	5'CGCGTG↓GATCCtctagttctgattccgat 3'	3'CTTAAC↓TCGAGTCActactcggcgtggcct 5'

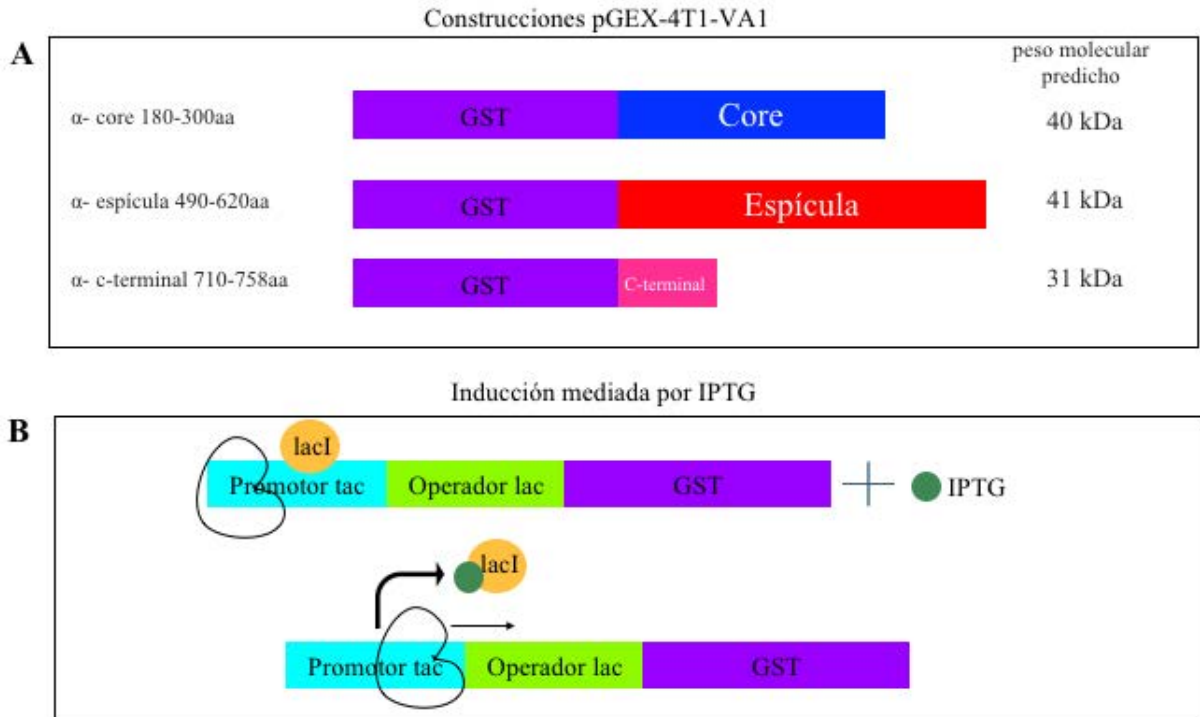


Figura 8. Construcciones pGEX-4T1-VA1 y mecanismo de inducción mediado por IPTG. A) Construcciones VA1-pGEX-4T1. Se muestran las 3 diferentes construcciones y los pesos moleculares predichos para cada una. B) El vector consiste de un promotor tac (fusión del promotor lac y trp), el cual se encuentra reprimido por lacI impidiendo la transcripción de la proteína GST y lo que se encuentre fusionado a ella. Al agregar el inductor IPTG, este desplaza al represor lacI y permite el avance de la RNA polimerasa.

Extracción de RNA

A 200 µl de lisado viral se agregaron 800 µl de trizol (Invitrogen), se vortexeó y se dividió en dos tubos de 500 µl. A cada tubo se le adicionaron 200 ul de cloroformo, se vortexeó y centrifugó a 16,000 x g durante 15 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se agregó 1 volumen igual de isopropanol. Se mezcló y se volvió a centrifugar a 16,000 x g durante 15 min a 4°C. El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se quitó el etanol y se centrifugó durante 10 min para secar el pellet. Finalmente, el pellet se resuspendió en 40 µl de H₂O.

Síntesis de cDNA

Se mezcló el RNA con el oligo anti-sentido de cada region que se quería amplificar y se incubó a 65°C durante 5 min. En un tubo diferente, se realizó la mezcla de RT-PCR (5x RT

buffer, 12.5 mM dNTPs, 0.1 M DTT, Super script III (Thermofisher) y H₂O) la cual se incubó a 22°C durante 5 min. De manera posterior, se juntó el RNA con la mezcla RT-PCR y se introdujo en el termociclador (BIO-RAD) 60 min a 50°C y 20 min a 85°C. El cDNA obtenido se guardó a -70°C.

RT-PCR

Se realizó la mezcla PCR-MIX (5X SuperFi buffer, 10mM dNTP, 10 µM oligonucleotido sentido, 10 µM oligonucleotido anti-sentido, cDNA, 5X SuperFi Enhancer, Platinum SuperFi DNA Polymerase 2 U/µl y H₂O libre de nucleasas) y se realizó el PCR bajo las siguientes condiciones:

Tabla 2. Programa de PCR utilizado para la amplificación de los insertos.

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	94° C	3 min
30 ciclos	94° C	30 seg
	55° C	30 seg
	72° C	2 min
1 ciclo	72° C	5 min

Corte con las enzimas BamHI y XhoI

Se tomó 1.5 µg del vector pGEX-4T1 y se cortó simultáneamente con las enzimas BamHI y XhoI (Thermo Fisher Scientific) por 1h a 37°C, utilizando el buffer Tango 2x, H₂O y con un exceso de 2 veces la enzima BamHI respecto a XhoI. Para cortar los insertos se tomó 500 ng de cada inserto y se cortó con las mismas condiciones para el corte del vector. Tanto el vector como los insertos se purificaron por columna.

Ligación de los insertos y el vector

Se realizó la mezcla de ligación (proporción 1:3, pGEX-4T1 20 ng, inserto de interés 4, 4.7 y 1.8 ng, respectivamente, 1 µl T4 DNA ligasa (New England Biolabs), 1 µl buffer T4 DNA ligasa y H₂O libre de nucleasas) y se dejó ligando toda la noche a 16° C.

Transformación de bacterias JM101 quimiocompetentes

Se tomó un volumen de ligación y se agregó 1 volumen de KCM (100mM KCl, 30 mM CaCl₂, 50mM MgCl₂), se dejó durante 5 min en hielo y se mezcló con las bacterias quimiocompetentes, las cuales se incubaron 30 min en hielo. Después se les dió un choque térmico a 42° C durante 45 seg. A continuación, se dejaron 3 min en hielo y se mezclaron con el medio de recuperación (960 µl medio LB (Luria Bertani), 20 µl glucosa 1 M, 20 µl MgCl₂ 1 M) donde se quedaron 60 min a 37° C. De manera posterior se centrifugo a 2375 x g durante 5 min y se resuspendio el pellet en 200 µl de medio LB. Finalmente, se plaquearon las bacterias en cajas Petri con medio LB y 100 µg/ml de Cb (carbenicilina).

PCR en colonia

Para el PCR de colonia se preparó una mezcla de reacción (3 µl dNTPs 12.5 mM, 1.5 µl oligonucleotido sentido (40 pmol/µl), 1.5 µl oligonucleotido anti-sentido (40 pmol/µl), 15 µl Thermo pol Buffer, 1.5 µl Taq DNA pol y H₂O libre de nucleasas). De esta mezlca se tomaron 10 µl para cada tubo. En condiciones de esterilidad se picó una colonia con el plásmido deseado utilizando una punta de pipeta y se resuspendió dicha punta en los tubos con la mezcla de PCR e inmediatamente después se depositó la misma punta en un tubo Eppendorf con 200 µl de medio LB más el antibiótico de selección. Las colonias depositadas en los tubos con la punta se incubaron a 37° C en agitación y los tubos de PCR fueron sometidos al programa mencionado anteriormente.

Inducción y enriquecimiento de las proteínas a inmunizar

Se crecieron las colonias positivas en 2 ml de medio LB con 100µg/ml de Cb durante 1 h a 37°C. Después, 20 ml de medio LB con Cb, se inocularon con los 2 ml de las bacterias crecidas y se incubaron durante 3 h a 37°C en agitación. De manera posterior, se añadió 1 µl/ml de IPTG 1M durante 3 h a 37°C en agitación. Se centrifugó a 3,985 x g durante 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1.5 ml de PBS 1x. Para romper las bacterias y enriquecer las proteínas recombinantes, se sonicó 3 veces, con pulsos de 50 segundos y 10 segundos de descanso, con una amplitud de 30% (Sonics) y se añadió 1% de Tritón X-100 y se incubó 15 min en hielo. A continuación, se centrifugó a 18,327 x g durante

10 min a 4°C, y se resuspendió el pellet en 5 ml de buffer de lavado (5 ml Tris 8.0, 0.4 ml EDTA 0.5M y 38 µl B-mercaptoetanol en un volumen final de 100 ml). Se centrifugó a 6,940 x g durante 10 min a 4°C y se volvió a lavar el pellet 4 veces más con el buffer de lavado. Finalmente, se realizó un lavado con 1M de urea y se lavó por ultima vez con agua destilada. El pellet final se resuspendió en 500 µl de agua destilada y se guardó a -20°C.

Inmunización de conejos

Se corrió en un gel SDS-PAGE al 10% las 3 proteínas de interés cargando un aproximado de 100 µg de proteína de cada una y se tiñó con azul de coomasie por 20 min. El gel se destiñó con ácido acético al 10% durante 3 horas, se cortó la banda de interés que corresponde a la proteína y se lavó con agua destilada 5 veces. A continuación, se congeló el gel con hielo seco y se trituró hasta que pudiera ser fácilmente recolectado con una jeringa y se agregó 1 ml de PBS 1x estéril.

Se inmunizaron 3 conejos New Zeland, uno para cada anticuerpo contra cada proteína. Los conejos se inmunizaron cada 2 semanas, hasta tener 4 inmunizaciones totales (Figura 9). Una semana después de la 3ª inmunización se realizó un pre- sangrado donde se obtuvo 1 ml de sangre a partir de la oreja de los conejos para probar el anticuerpo. Finalmente, 4 días después de la 4ª inmunización se sangraron a blanco por medio de una punción cardiaca. La sangre obtenida se guardó a 4°C; una vez que se formó el cuagulo se tomó el suero y se mezcló con glicerol en una dilución 1:1, se alicuotó y guardó a -70 °C.

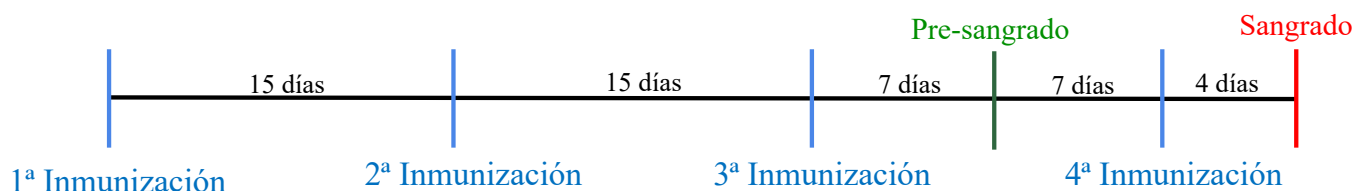


Figura 9. Esquema de inmunización utilizado para la producción de anticuerpos en conejos. Se realizó un total de 4 inmunizaciones. Cada inmunización se realizó separada por un periodo de tiempo de 15 días. Después de la 3ª inmunización, a los 7 días se obtuvo 3 ml de sangre para comprobar el anticuerpo, 7 días después de realizó la 4ª inmunización y a los 4 días se sangró a blanco.

RESULTADOS

El astrovirus VA1 puede crecer en diferentes medios, con o sin suero, sin afectar el procesamiento de las proteínas de la cápside y su título viral.

Recientemente se describió la adaptación de la cepa de astrovirus VA1 a crecer en cultivo celular, lo que representó un primer paso importante para poder estudiar su biología. Sin embargo, para caracterizar aspectos fundamentales de su ciclo de replicación es necesario poder crecer al virus eficientemente. Por esta razón, el primer objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones para lograrlo en la línea celular Caco-2, derivada de células intestinales humanas.

Para esto, se evaluaron varios medios de crecimiento y el efecto de la presencia de suero bovino fetal sobre el título viral obtenido. Para obtener altos títulos de virus infeccioso, los siguientes parámetros de la infección se mantuvieron fijos desde el inicio, con base en la experiencia previa de nuestro laboratorio: i) empleo de una multiplicidad de infección baja (0.01) para evitar la producción de partículas defectuosas; ii) un periodo de adsorción del virus a las células de 2 h para maximizar el número de partículas virales que se unen a la superficie celular, considerando que el lote de virus inicial recibido del Dr. Wang parecía tener un título infeccioso bajo. Este tiempo de adsorción habría que compararlo posteriormente con 1 h, que es el tiempo usual de adsorción para otros virus que se manejan en el laboratorio; iii) 7 días de incubación de las células infectadas para permitir al menos 3 ciclos de replicación viral y así lograr infectar la totalidad, o cuando menos la mayor parte de las células Caco-2 en el cultivo.

El título infeccioso del virus se determinó a través del ensayo de inmunocitoquímica (inmunoperoxidasa) que comúnmente se utiliza en nuestro laboratorio para determinar la infectividad de diversos virus, como astrovirus, rotavirus, SV40, entre otros (ver Materiales y Métodos). Este ensayo para detectar las células infectadas con el virus VA1 lo adaptó inicialmente en nuestro laboratorio el Dr. Tomás López, utilizando un anticuerpo generado contra la proteína de cápside del virus (anticuerpo DB, ver Materiales y Métodos). La figura 10 muestra la detección de las células infectadas utilizando el ensayo de inmunoperoxidasa.

Los títulos obtenidos en estas condiciones, cuantificados por medio de inmunoperoxidasa, alcanzan 1×10^7 uff/ml (Figura 10).

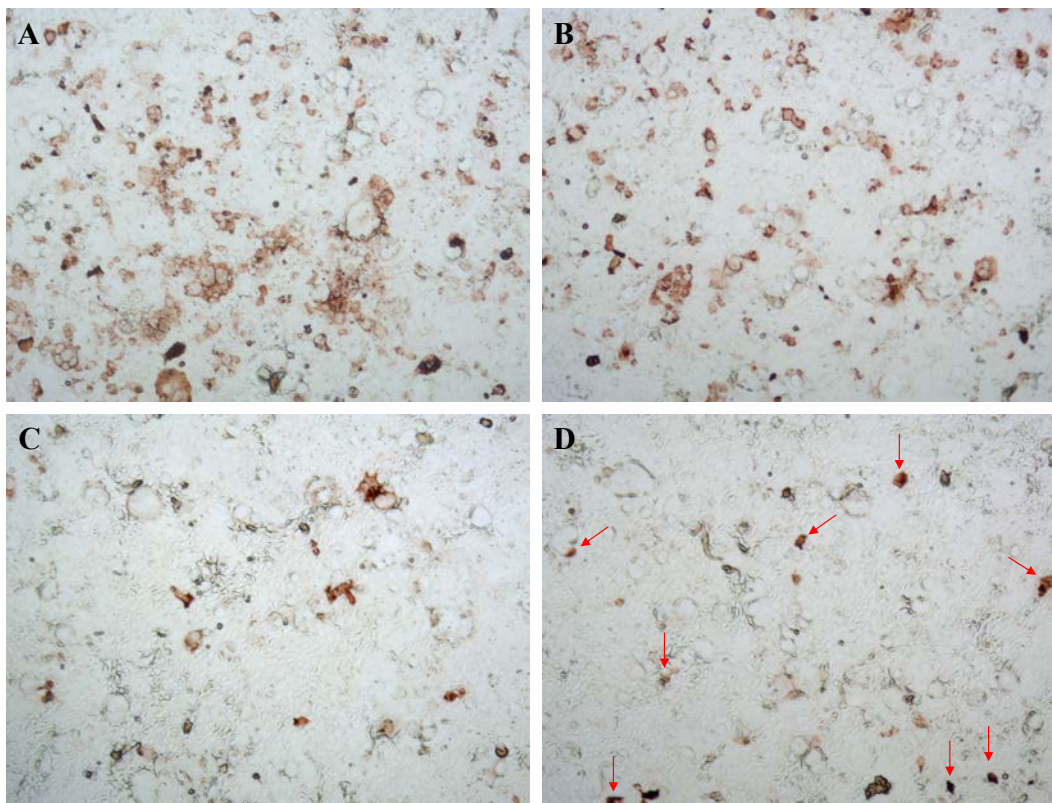


Figura 10. Ensayo de inmunoperoxidasa de células Caco-2 infectadas con astrovirus VA1. Se muestran células Caco-2 infectadas durante 48 h con diluciones decrecientes seriadas (A 1:9, B 1:27, C 1:81 y D 1:1243) de una semilla de VA1. Las células infectadas son las que se observan teñidas de rojo/café oscuro (indicadas con flechas en el panel D). Cada célula infectada es resultado de la infección de una sola partícula viral, y se le conoce como “foco infeccioso”.

El crecimiento del virus en células Caco-2 fue inicialmente reportado utilizando el medio de crecimiento DMEM HG en presencia de 10 % de suero bovino fetal (SFB) (Janowski et al. 2017; Janowski and Wang 2019). Quisimos de inicio evaluar si el virus requiere de la presencia de suero para llevar a cabo su ciclo replicación, ya que los astrovirus clásicos no lo requieren, y de hecho inhibe su crecimiento cuando es necesario que ocurran varios ciclos de replicación. Para esto, realizamos una curva de crecimiento de un solo ciclo infectando con una multiplicidad de infección (MOI) de 3 y determinando el título viral producido a las 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 h post-infección (hpi) utilizando el medio DMEM HG en presencia

o ausencia de SBF al 10%. A los tiempos indicados se colectaron las células infectadas, se congelaron y descongelaron tres veces y se determinó el título de virus infecciosos por medio del ensayo de inmunoperoxidasa (Figura 11). Igualmente, se caracterizó la producción de proteína viral a los diferentes tiempos por medio de Western blot (Figura 12).

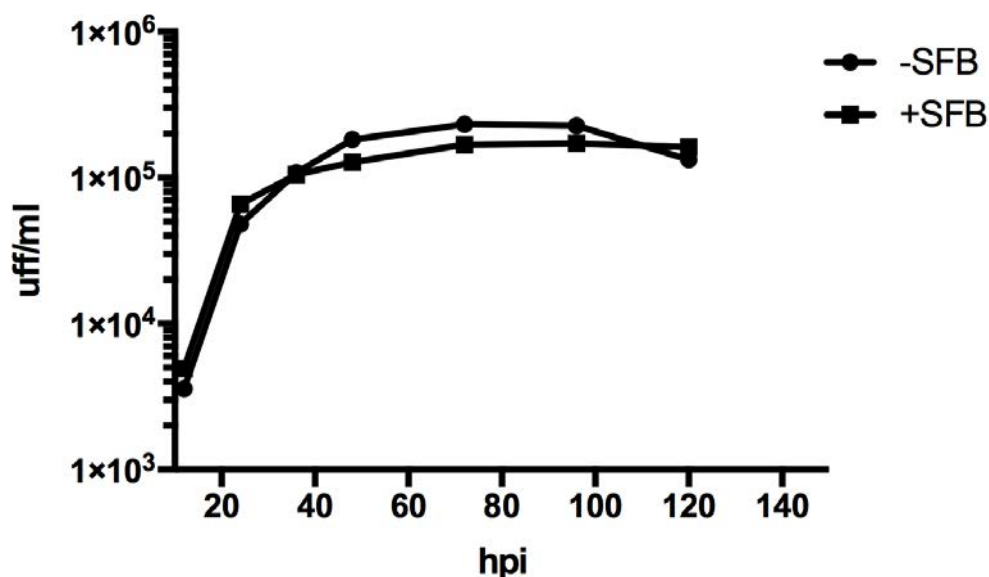


Figura 11. Curva de crecimiento total de VA1 en presencia y ausencia de suero bovino fetal al 10% en células Caco-2. Se llevó a cabo la infección con una MOI de 3 durante los tiempos indicados. El título viral se determinó por un ensayo de inmunoperoxidasa. Los datos están expresados como unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro (uff/ml).

Como se puede apreciar en la figura 11, no se observaron diferencias significativas en el título viral a los diferentes tiempos post-infección en presencia o ausencia de suero. Por otro lado, esta curva de crecimiento nos permitió determinar que hay un aumento en la cantidad de virus producido a partir de las 12 hpi, llegando a un máximo a las 48 hpi; no se observó un aumento significativo en el título después de este tiempo. Esta curva de crecimiento, siguiendo el título viral producido hasta 5 días después de la infección se llevó a cabo una sola vez, ya que era un experimento exploratorio para determinar el tiempo máximo de producción del virus. Considerando estos resultados, las siguientes curvas de crecimiento se hicieron hasta las 72 hpi.

Al analizar las muestras por Western blot (Figura 12) es posible apreciar claramente la producción de proteína viral desde las 24 hpi y hasta las 120 hpi en ambas condiciones, con

un máximo de producción de proteínas del virus a las 48 hpi, lo que confirma los datos de producción de la progenie viral mostrados en la curva mostrada en la figura 11. Es posible apreciar diferentes cantidades de proteínas +/- suero, lo cual puede deberse a la cantidad de muestra cargada en el gel o al tiempo de exposición de la membrana.

Otra observación muy interesante fue que, a pesar de que se ha reportado que VA1 no requiere ser tratado con tripsina para ser infeccioso, el análisis por Western blot con el anticuerpo DB mostró que la proteína precursora de cápside observada, de 91 kDa (esperada de 84 kDa, ver adelante), se procesa proteolíticamente durante el ciclo de replicación del virus para dar varios productos de la proteólisis. Por otro lado, el hecho de que el procesamiento ocurra tanto en presencia como en ausencia de suero en el medio extracelular sugiere fuertemente que el procesamiento ocurre en el interior de las células, ya que el suero inhibe la tripsina extracelular.

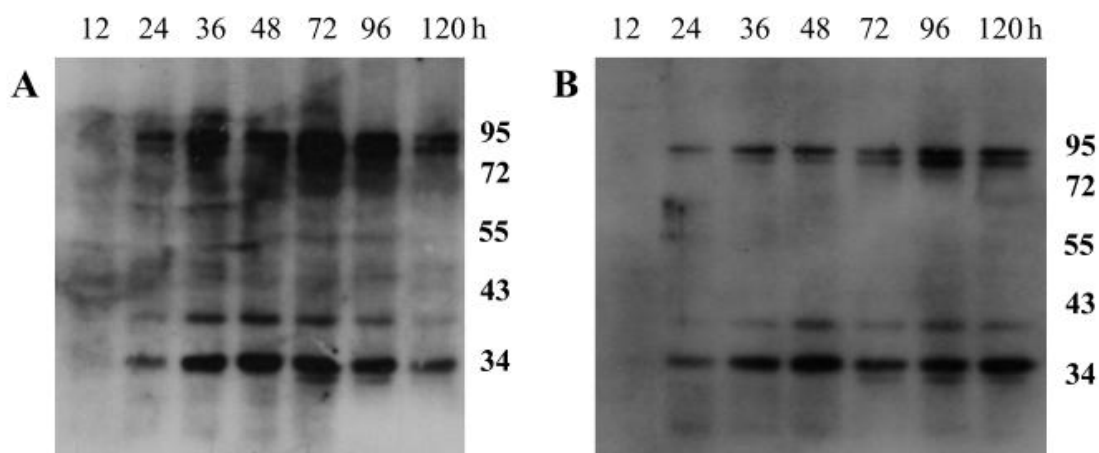


Figura 12. Western blot de las proteínas virales sintetizadas a diferentes tiempos durante la curva de crecimiento de VA1 en presencia (A) y ausencia (B) de suero bovino fetal.

Después de evaluar el efecto del SBF sobre el crecimiento viral, ensayamos el efecto de diversos medios de crecimiento. Determinamos la producción de proteína y el título de la producción de virus a las 48 hpi en células infectadas a una MOI de 3, utilizando los siguientes medios: MEM, DMEM HG y DMEM Adv en presencia y ausencia de suero (Figura 13), este experimento se realizó una vez.

La producción de proteínas virales fue mayor en el medio DMEM HG +/- suero, y menor en el medio MEM sin suero y DMEM Adv +/- suero. Todas las condiciones evaluadas dieron un título viral dentro del mismo logaritmo, siendo el medio MEM sin suero el más bajo. A partir de esta información nos quedamos con las siguientes condiciones para generar lotes de semilla viral con alto título: infección con una MOI=0.01 durante 7 días en DMEM HG, adsorbiendo el virus durante un periodo de 2 h. Con estas condiciones se pueden obtener títulos virales de hasta 1×10^7 uff/ml. También, con base en la curva de crecimiento, definimos para los experimentos subsecuentes llevados a cabo con multiplicidades altas (MOI=3 o más) analizar la producción de virus a las 48 hpi. Con una MOI de 3 se infectan el 95% de las células.

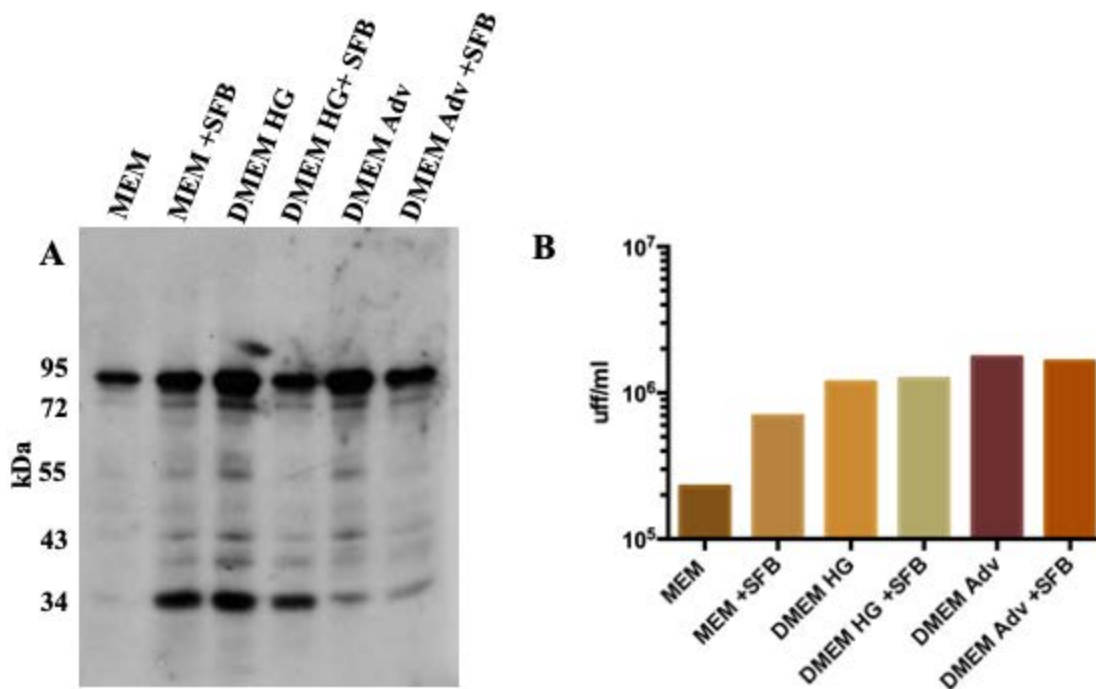


Figura 13. Efecto de diferentes medios +/- 10% de suero bovino fetal en el crecimiento de VAI. A) Western blot de las proteínas virales sintetizadas utilizando los medios MEM, DMEM HG y DMEM Adv en presencia y ausencia de suero. B) Título viral obtenido utilizando los medios MEM, DMEM HG y DMEM Adv en presencia y ausencia de suero.

La curva de crecimiento de un solo ciclo del astrovirus VA1 es similar a la de los astrovirus clásicos en la línea celular Caco-2, sin embargo, se encuentra retrasada en las etapas tempranas de la infección.

Una vez establecido que no hay diferencias en el crecimiento del virus en presencia o ausencia de suero, se realizó una curva de crecimiento de un solo ciclo en el medio DMEM HG, en ausencia de suero, con el propósito de identificar las etapas del ciclo de replicación del virus (periodo de eclipse, periodo de explosión y fase estacionaria) en la línea celular Caco-2. Se infectaron células con una MOI de 5, y a 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 hpi se colectaron el medio extracelular y las células de manera independiente. La concentración de virus infeccioso en cada una de las fases se determinó a los diferentes tiempos (Figura 14).

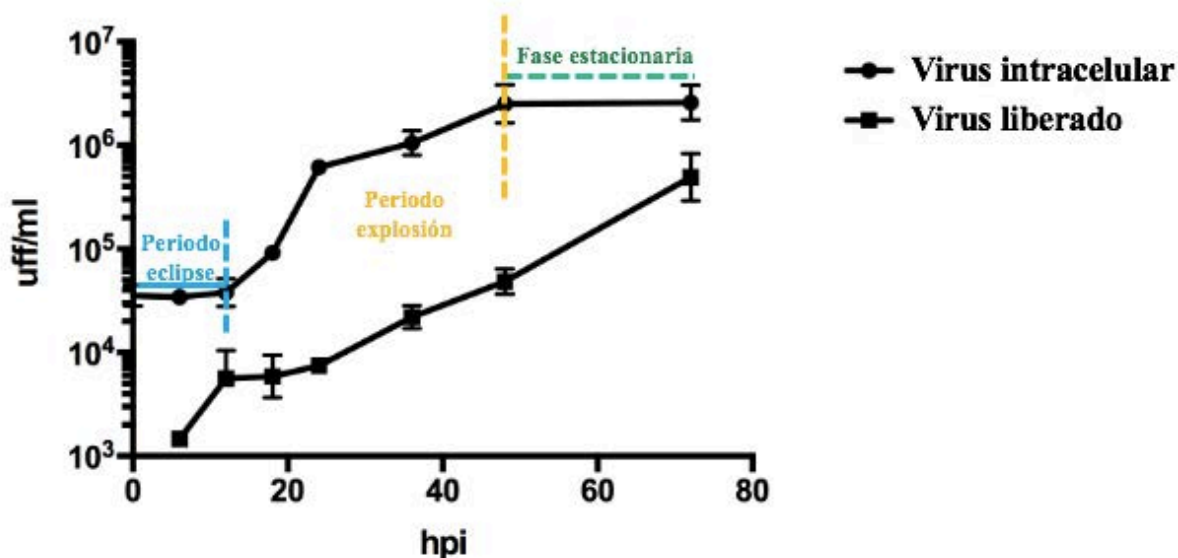


Figura 14. Curva de crecimiento de VA1 en ausencia de suero bovino fetal en células Caco-2. Se llevó a cabo una infección a MOI de 5 y a los tiempos indicados post-infección se colectaron el medio extracelular (virus liberado) y las células (virus intracelular) de manera separada. Después de congelar y descongelar tres veces las células para lisarlas, el título viral se determinó por un ensayo de inmunoperoxidasa. Los datos son expresados como unidades formadoras de focos por mililitro (uff/ml). Las barras presentan el error estándar de la media de 3 ensayos independientes (n=3) y se analizaron por medio de Graph Prism.

El gráfico muestra las etapas de crecimiento que se observan usualmente durante la replicación de los virus (Figura 14). Para el virus detectado dentro de las células (esto es, que no se encontraba en el medio extracelular), observamos un periodo de eclipse, que para el

caso de VA1 fue de 12 h de duración. En principio, en este periodo no es posible recuperar virus infeccioso pues las partículas virales han liberado su material genético para comenzar su replicación y traducción; la pequeña cantidad de virus infeccioso detectado probablemente es el virus adsorbido a la superficie celular que no penetró a la célula y que, por lo tanto, su material genético no se desnudó (esto es, siguió dentro de la cápside) y por lo tanto permaneció infeccioso. Posteriormente sigue el periodo de explosión (“burst”), de las 12 a las 48 hpi, donde el virus intracelular comienza a incrementar y se producen grandes cantidades de partículas virales. Finalmente, se observó la fase estacionaria a partir de las 48 hpi, etapa en la que la producción de virus se detiene; durante este periodo las células se vuelven metabólicamente inactivas, por lo que son incapaces de soportar la replicación viral. Por otro lado, en el medio extracelular se detectó el virus a partir de las 18 hpi, lo cual indica la liberación de partículas infecciosas, lo cual ocurre de manera gradual hasta llegar al 10% de partículas liberadas (en relación al total de virus infecciosos producido) a las 72 hpi.

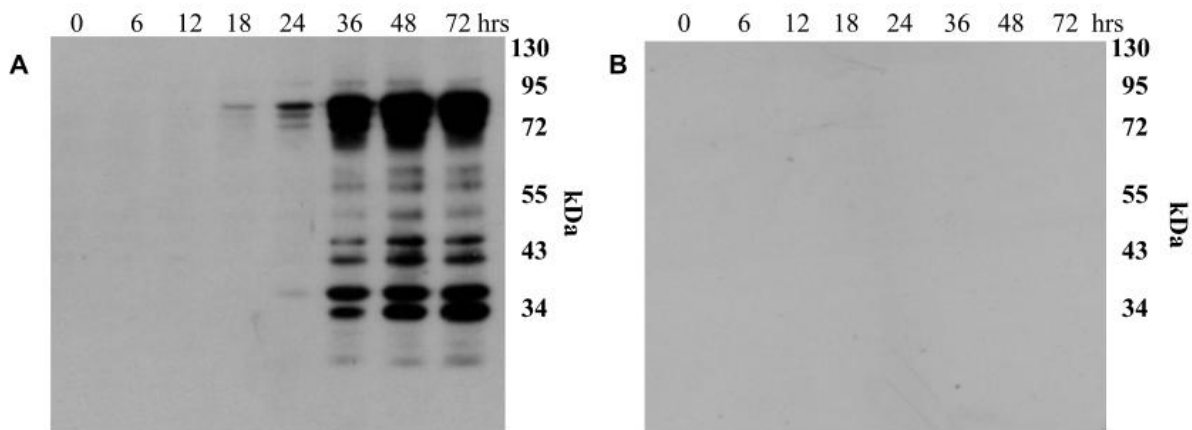


Figura 15. Proteínas del virus VA1 sintetizadas en ausencia de suero bovino fetal en células Caco-2, detectadas en las células y en el medio extracelular. A) proteínas virales en las células; B) proteínas virales en el medio extracelular. Se observa la presencia de proteína viral a partir de las 18 hpi en las células. No se observa proteína en ningún tiempo en el sobrenadante.

Al analizar las muestras por Western blot (Figura 15) es posible apreciar en las muestras que corresponden a las células la presencia de proteína viral a partir de las 18 hpi y un incremento a las 24 y 36 hpi. A partir de las 48 hpi se observa un máximo de síntesis de proteína, que no parece incrementarse a las 72 hpi. A ningún tiempo post-infección pudimos detectar proteínas

virales en el medio extracelular, esto debido a que, el bajo número de virus liberados al medio extracelular muy probablemente no puede ser detectado por el ensayo de Western blot.

Las caspasas y la tripsina no están involucradas en el procesamiento de las proteínas de cápside del astrovirus VA1.

Ya que los astrovirus clásicos requieren del corte mediado por caspasas para que las partículas formadas por VP90 se procesen a partículas formadas por VP70 y así liberar las partículas inmaduras de las células hacia el medio extracelular, exploramos el efecto de esta proteasa sobre el procesamiento proteolítico de la proteína precursora de la cápside del astrovirus VA1. Para esto, se infectó la línea celular Caco-2 con VA1 a una MOI de 3 y se incubó a 37°C durante 48 h en medio DMEM HG en presencia del inhibidor de caspasas ZVAD, el cual se une irreversiblemente al sitio catalítico de las caspasas e inhibe la inducción de apoptosis. Finalmente, se analizó el procesamiento de las proteínas por medio de Western blot (Figura 16).

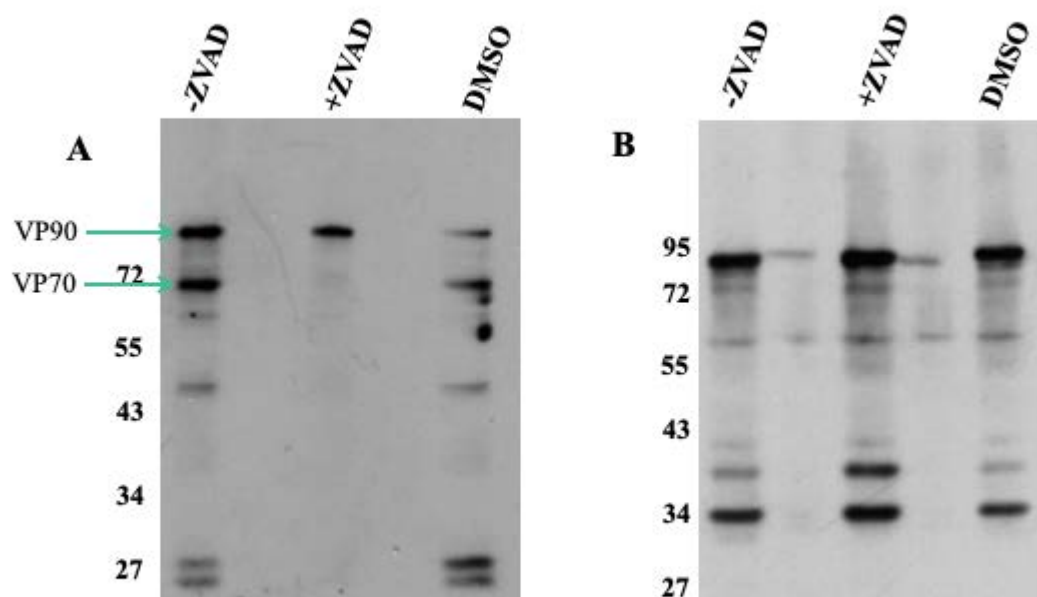


Figura 16. Efecto del inhibidor de caspasas ZVAD sobre el procesamiento de VA1. A) Se infectaron células Caco-2 con A) HAstV-8 o B) VA1, a una MOI de 3 y se incubó durante 48 h en ausencia de ZVAD (-ZVAD), en presencia de ZVAD (+ZVAD) o en presencia de DMSO, ya que el inhibidor se encuentra en este solvente. Las proteínas virales se analizaron por Western blot. Las flechas azules indican las proteínas VP90 y VP70 de HAstV-8.

Al analizar el Western blot obtenido a partir de la infección por HAstV-8, (Figura 16A) podemos apreciar que en ausencia del inhibidor de caspasas se observan las formas VP90 y VP70, señaladas con una flecha roja, como se había reportado previamente (Mendez, Salas-Ocampo, and Arias 2004), lo cual muestra el procesamiento de la poliproteína. Cuando agregamos el inhibidor ZVAD, sólo se observa la proteína VP90, por lo que el inhibidor de caspasas previene el procesamiento de esta proteína precursora, como se reportó previamente en nuestro laboratorio (Banos-Lara and Méndez 2010; Mendez, Salas-Ocampo, and Arias 2004). Finalmente, el control de DMSO muestra que este solvente no afecta el procesamiento de las proteínas. Por otro lado, al infectar con el astrovirus VA1 en ausencia de ZVAD apreciamos un patrón de bandas que parece mantenerse en presencia de ZVAD, lo que indica que el astrovirus VA1 no es procesado por caspasas, a diferencia de los astrovirus clásicos.

El inhibidor de caspasas tampoco inhibió la replicación viral, midiendo la progenie viral producida en presencia o ausencia de ZVAD a las 48 hpi (no se muestra el resultado).

Además del corte proteolítico por caspasas, los astrovirus clásicos requieren ser tratados con tripsina exógena para activar su infectividad, lo que causa el procesamiento proteolítico de la proteína precursora de la cápside, de 70 kDa, para dar un virión maduro, infeccioso, formado por dos polipéptidos de 27 y 34 kDa. En el caso de VA1 se ha descrito que la proteína precursora del virus no requiere ser procesada por tripsina para que su infectividad se active, sin embargo, no se había observado qué ocurría con las proteínas virales ni con la progenie viral al ser tratadas con tripsina. Para esto, virus purificado, recuperado del sedimento de una centrifugación a través de un colchón de sacarosa, o bien el material presente en el sobrenadante de esta centrifugación, esto es, que no atravesó el colchón de sacarosa (ver Materiales y Métodos) se trataron con 10, 20, 50, 100 y 200 µg/ml de tripsina durante 1 h a 37°C y de manera posterior se agregó la misma cantidad de inhibidor de proteasas y se observaron las proteínas por medio de Western blot y el título viral se determinó por inmunoperoxidasa (Figura 17 y 18).

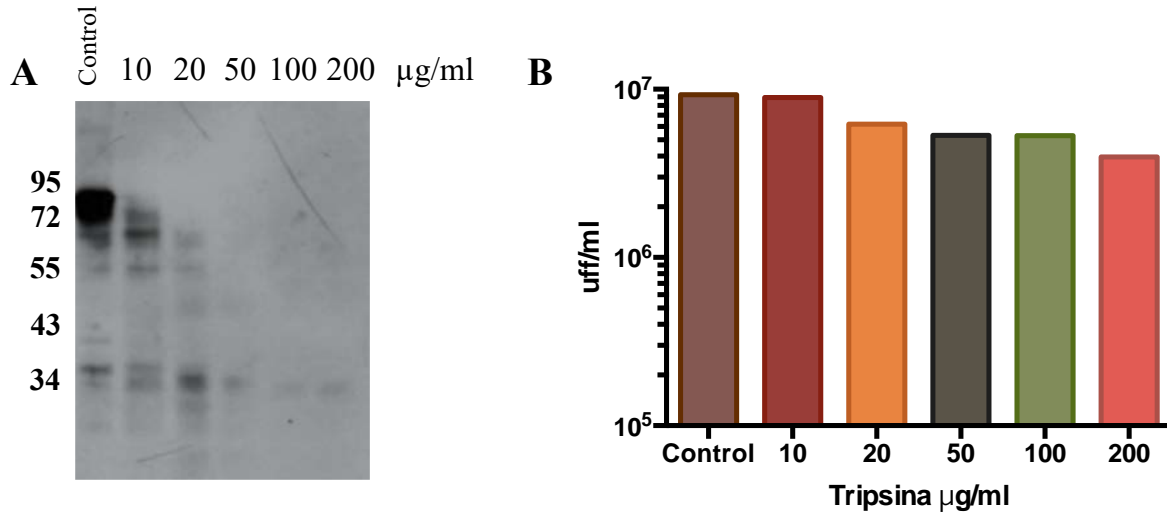


Figura 17. Efecto de la tripsina sobre el procesamiento de VAI y su progenie viral. A) Western blot del sobrenadante del virus purificado, incubado con las concentraciones de tripsina indicadas. B) Infectividad del sobrenadante del virus purificado incubado con las diferentes concentraciones de tripsina.

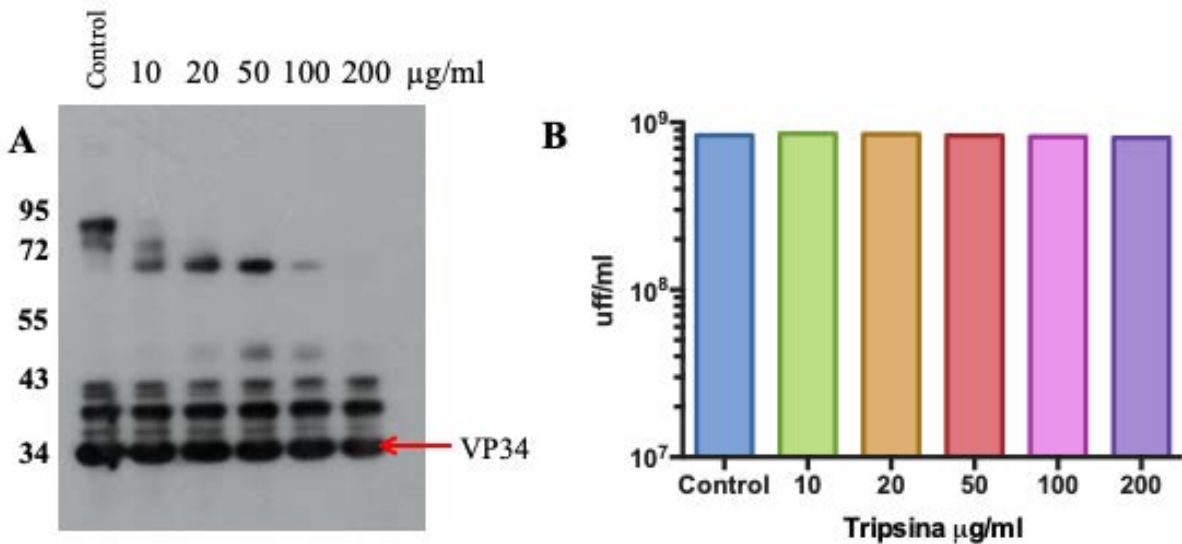


Figura 18. Efecto de la tripsina sobre el procesamiento de VAI y su progenie viral. A) Western blot del virus purificado, incubado con las concentraciones de tripsina indicadas. B) Infectividad del virus purificado incubado con las diferentes concentraciones de tripsina.

Al analizar por Western blot el estado de procesamiento de las proteínas virales presentes en las dos fracciones analizadas (Figura 17 y 18) podemos ver que la proteína precursora de 91

kDa presente en el sobrenadante del virus purificado parece ser digerida paulatinamente hasta quedar totalmente degradada cuando se incubó con una concentración de tripsina de 50 ug/ml o mayor, lo cual sugiere que las proteínas virales en el sobrenadante están solubles y no particuladas. En contraste con esto, cuando el virus purificado se incubó con concentraciones crecientes de tripsina, aparentemente la proteína precursora de 91 kDa también se degradó, pero la proteasa no tuvo ningún efecto sobre las proteínas de 34 y 38 kDa, que forman la partícula infecciosa del virus. Esto se confirmó al analizar el título viral y observar que éste no cambia en presencia de la tripsina (Figura 18 B). Es interesante que tampoco hubo un efecto en la infectividad detectada en el sobrenadante (Figura 17B), a pesar de que las proteínas virales esencialmente no se detectan por Western blot (Figura 17A). Esta infectividad es muy probablemente debida a partículas virales infecciosas que permanecieron en el sobrenadante, aunque no pudieron ser detectadas, o muy débilmente (ver la proteína de 34 kDa) que permanece aún a las concentraciones más altas de tripsina (Figura 17A).

Producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra diferentes partes de la proteína precursora de la cápside viral para analizar su procesamiento.

Para caracterizar el procesamiento de la poliproteína precursora de la cápside viral, codificada por el ORF2, se decidió preparar anticuerpos contra tres regiones de la poliproteína (Figura 19). Estas tres regiones se eligieron para que los anticuerpos reconocieran específicamente los dominios del core, la espícula y el extremo carboxilo terminal, con base en lo que se conoce de estos dominios en la proteína VP90 de los astrovirus clásicos (Figura 20).

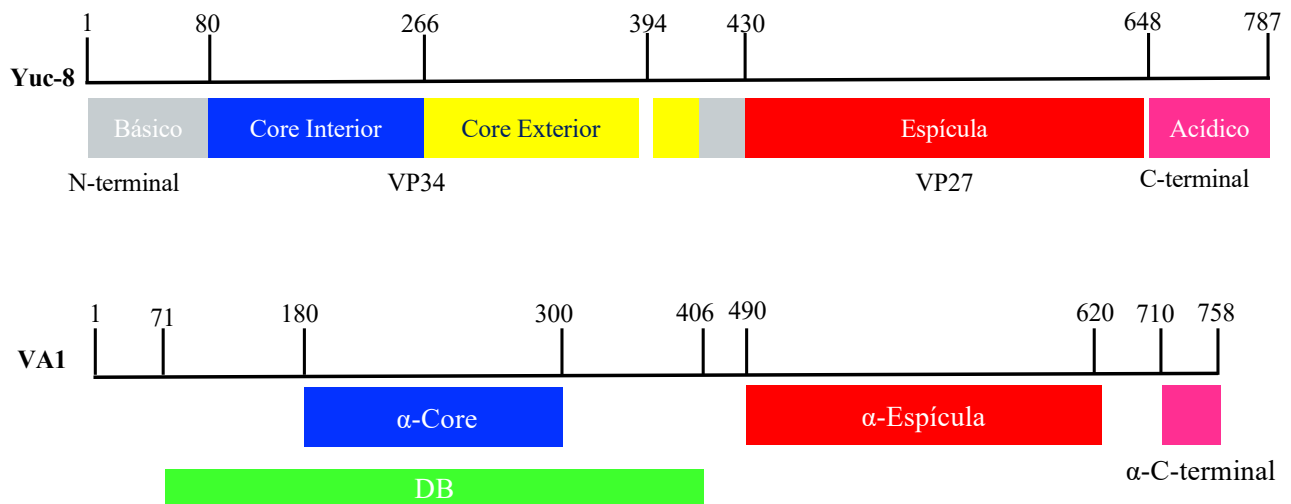


Figura 19. Esquema del ORF2 del astrovirus clásico Yuc-8 y el astrovirus VA1. La secuencia de aminoácidos del ORF2 de Yuc-8 consta de 787 aminoácidos, de los cuales del 80 al 394 conforman el core, y del 430 al 648 la espícula. El ORF2 de Yuc-8 se caracteriza por tener un extremo N-terminal básico y un extremo C-terminal ácido. Por otro lado, el ORF2 de VA1 se compone de 758 aminoácidos. La región utilizada como inmunógeno para producir el anticuerpo DB abarca desde el aminoácido 71 al 406.

Las regiones de la proteína precursora de VA1 que se eligieron para representar los dominios del core, espícula y carboxilo terminal están comprendidas de los aminoácidos 180 a 300 (α -core), 490 a 620 (α -espícula) y 710 a 758 (α -C-terminal), respectivamente. Estas regiones de la proliproteína de cápside se sintetizaron en *Escherichia coli* como proteínas de fusión C-terminal a GST (Figura 20).

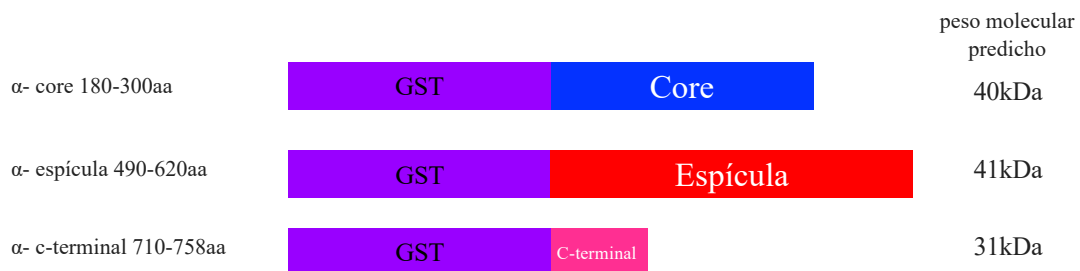


Figura 20. Construcciones VA1-pGEX-4TI. Se muestran las 3 diferentes construcciones y los pesos moleculares predichos para cada una.

La expresión de los plásmidos recombinantes correspondientes se indujo por incubación de las bacterias con IPTG, y las proteínas sintetizadas se analizaron en un gel de poliacrilamida. Como se puede observar en la figura, en presencia de IPTG se pudo detectar la síntesis de proteínas con el peso molecular esperado en las bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes (Figura 21).

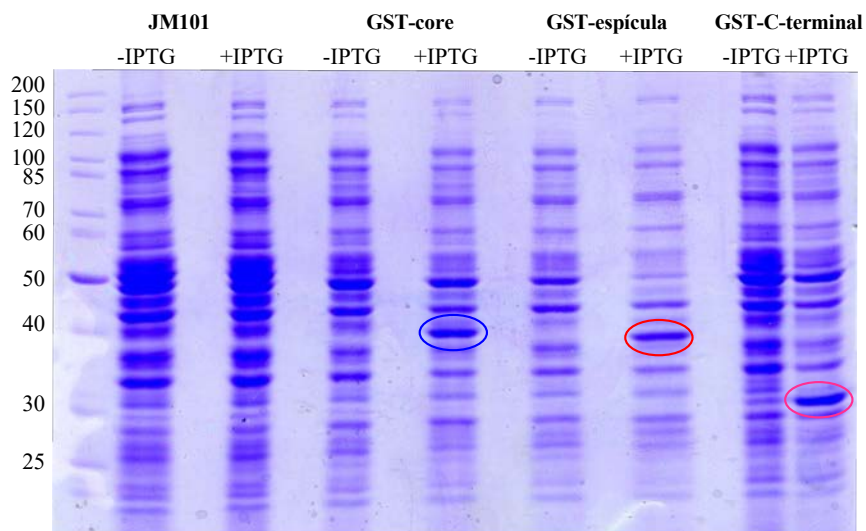


Figura 21. Gel de poliacrilamida de las proteínas de fusión en ausencia y presencia del inductor IPTG. Se muestran señaladas por un círculo la inducción de las 3 proteínas con el peso molecular esperado (señaladas con un círculo).

Posteriormente se caracterizó la solubilidad de las proteínas recombinantes. Para esto se indujo la síntesis de las proteínas y se evaluó si estaban solubles o formando cuerpos de inclusión (ver Materiales y Métodos). En la figura 22 se puede observar que las proteínas fueron insolubles, estando presentes probablemente como cuerpos de inclusión en las bacterias. Por esta razón, para la generación de los sueros hiperinmunes contra las diferentes regiones, se utilizaron como antígeno las proteínas cortadas directamente de los gels de poliacrilamida (Figura 23).

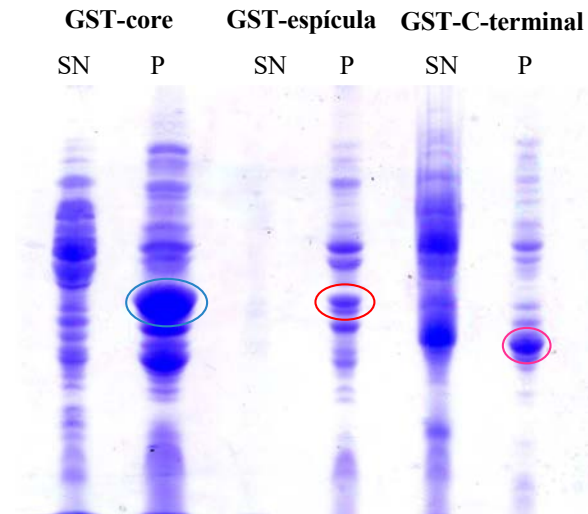


Figura 22. Gel de poliacrilamida de las proteínas de fusión después del protocolo de enriquecimiento. Se muestran las 3 proteínas con sus respectivos sobrenadantes (SN) y pellets (P). En los tres casos las proteínas se encuentran insolubles (señaladas con un círculo).

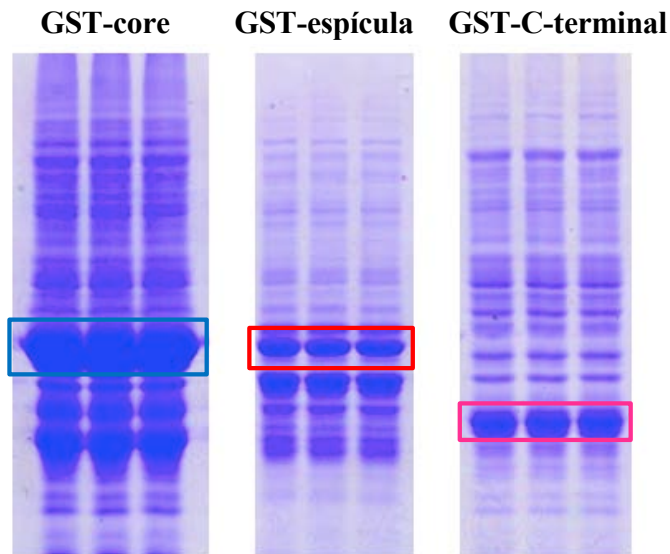


Figura 23. Geles de poliacrilamida preparativo de las proteínas de fusión de los cuales se cortaron para la producción de sueros hiperinmunes en conejos. Se muestra dentro de un cuadro las proteínas de interés.

Después del protocolo de inmunización descrito en Materiales y Métodos, se analizó la reactividad de los sueros hiperinmunes producidos con las proteínas virales por Western blot. También utilizamos para la caracterización de las proteínas virales un suero hiperinmune que

había sido preparado previamente en el laboratorio por la QFB Rafaela Espinosa, dirigido contra la región de la poliproteína precursora de VA1 comprendida entre los aminoácidos 71 al 406 (Figura 19). A este suero le llamaremos DB.

El análisis por Western blot de lisado de células infectadas con VA1 utilizando el anticuerpo DB (Figura 24) mostró dos proteínas precursoras, una de 91.2 kDa y otra de 85 kDa, además de cuatro proteínas de menor peso molecular, de entre 34 y 41 kDa. No se observaron proteínas en lisado celular no infectado. Por otro lado, cuando se analizó la reactividad de estos anticuerpos con el virus purificado se observaron dos bandas, de 34 y 38 kDa, respectivamente. Considerando que el sitio de inicio del dominio de espícula no estaba determinado, especulamos que este suero hiperinmune podría estar reconociendo tanto al core como a la espícula de la partícula, representados por las dos bandas observadas.

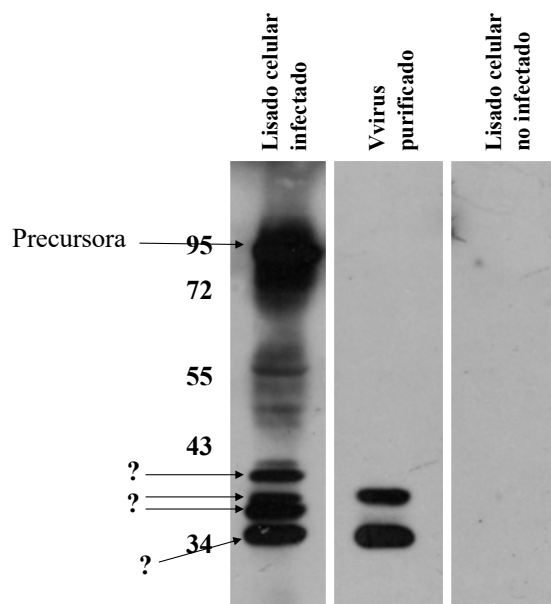


Figura 24. Western blot utilizando el anticuerpo DB y un lisado de células infectadas o no infectadas y virus purificado.

Para identificar el origen de las dos bandas observadas utilizamos los anticuerpos contra las diferentes regiones de la proteína precursora. El anticuerpo policlonal dirigido contra el core (Figura 25) reconoció por Western blot en el lisado celular infectado a la proteína precursora

y a tres proteínas de peso molecular de 34, 36 y 41 kDa. En el virus purificado se observa una sola proteína que concuerda con el peso molecular de 34 kDa, igual a la observada en el virus purificado utilizando el anticuerpo DB. Estos hallazgos muestran que esta banda corresponde al core. Las otras dos proteínas, de 36 y 41 kDa parecen ser entonces intermediarios del procesamiento de la proteína del core.

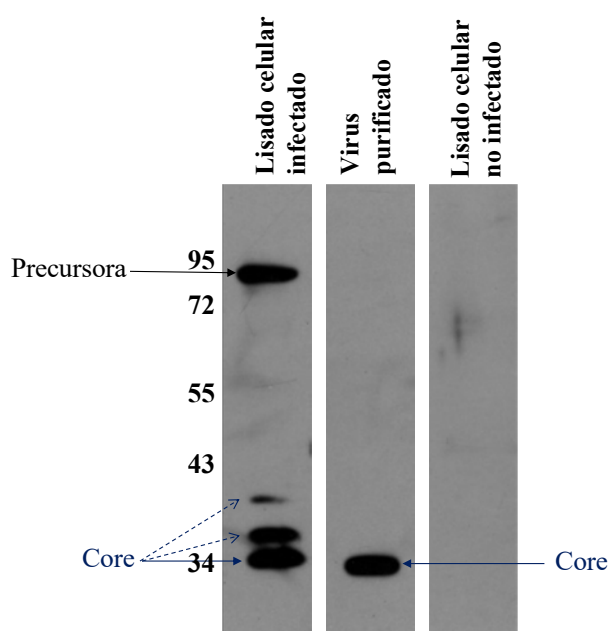


Figura 25. Western blot utilizando anticuerpo α -core en lisado celular infectado, virus purificado y lisado celular no infectado. Con líneas punteadas se señalan los dos intermediarios del core de 36 y 41 kDa. No se observan proteínas en lisado celular no infectado.

El suero hiperinmune que esperábamos reconociera a la espícula y al extremo carboxilo terminal no mostraron una señal clara, esto posiblemente por la metodología de utilizar las proteínas cortadas de gel, las que pueden estar contaminadas con proteínas bacterianas y también por baja inmunogenicidad. Sin embargo, se planea realizar nuevos anticuerpos contra estas regiones.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos mediante el análisis de los diferentes intermediarios de procesamiento de la proteína precursora viral por WB, podemos concluir lo siguiente: i) las proteínas observadas utilizando lisado celular infectado corresponden a 1 o 2 proteínas precursoras de 91.2 y 85 kDa; ii) estas proteínas precursoras son procesadas

por una o varias proteasas intracelulares, aun no identificadas, que producen una espícula de 38 kDa y un core de 36 kDa; iii) el core parece tener un intermediario de 41 kDa y otro de 36 kDa. Por otro lado, desconocemos cuantos intermediarios tiene la espícula. La figura 26 muestra la identificación de los diferentes productos de procesamiento de la poliproteína precursora de la cápside VA1.

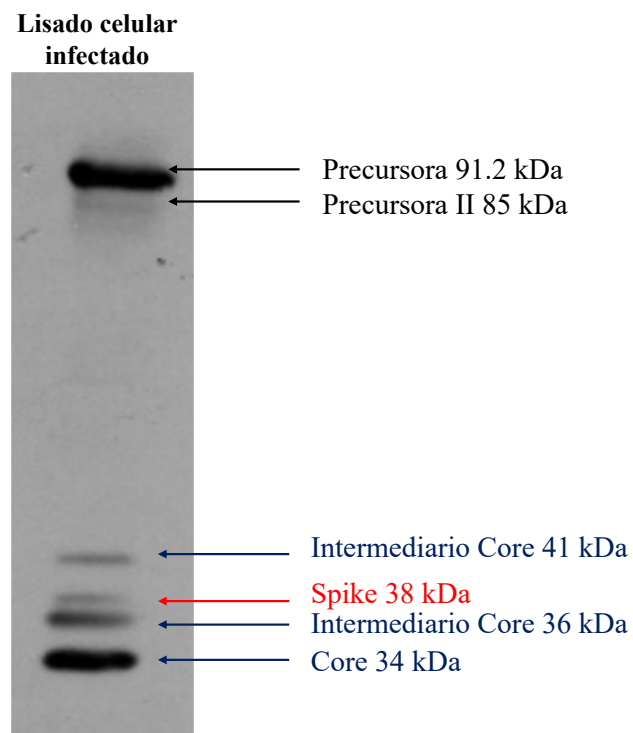


Figura 26. Western blot utilizando anticuerpo DB en lisado celular infectado.

DISCUSIÓN

Los astrovirus de humano son agentes infecciosos que típicamente infectan el tracto gastrointestinal produciendo gastroenteritis en niños y adultos mayores. Sin embargo, en el año 2009 (Ruone et al. 2009) se descubrió por medio de secuenciación de próxima generación al astrovirus VA1. El astrovirus VA1 ha sido encontrado en cinco pacientes inmunocomprometidos que presentaban un cuadro de encefalitis (Frémond et al. 2015; Jacques et al. 2015; Lum et al. 2016; Naccache et al. 2015; Quan et al. 2010). En el 2017, Janowski y col. adaptaron a crecer el virus en células Caco-2, línea celular derivada de epitelio intestinal humano que resultó permisiva para la replicación del virus VA1, al igual que para los astrovirus clásicos.

Queriendo profundizar más en el conocimiento de la biología del virus VA1 nos propusimos optimizar y caracterizar su crecimiento en células Caco-2, así como explorar si esta cepa de astrovirus, que se había reportado no requería ser tratada con tripsina para infectar las células (contrario a lo observado con los astrovirus clásicos), realmente podía ingresar a la célula sin que su cápside sufriera un procesamiento proteolítico, lo cual es común en los astrovirus de humano clásicos, así como en muchos astrovirus que infectan animales.

Los astrovirus clásicos se crecen en cultivo celular en ausencia de suero bovino fetal ya que en su presencia se disminuye el corte proteolítico (causado por tripsina) de la proteína de 70 kDa (ya que actúa como inhibidor de proteasas), necesario para la infección del virus y por lo tanto se obtiene un bajo título de virus infeccioso. Debido a este antecedente llamó la atención que el crecimiento del astrovirus de humano VA1 no requiriera ser activado proteolíticamente por tripsina, y por lo tanto pudiera también crecer en presencia de SBF. En este trabajo evaluamos el crecimiento del virus en diferentes medios de cultivo en presencia y ausencia de SBF y confirmamos que efectivamente, el SBF no afecta su crecimiento y tampoco requiere de ser tratado con tripsina para ser infeccioso. Sin embargo, observamos que aun sin tratamiento exógeno con esta proteasa, y creciendo el virus en presencia de SBF, al analizar la progenie viral resultante de la infección por Western blot, la proteína precursora

de la cápside sí es procesada proteolíticamente. Esto sugiere fuertemente que la proteasa que procesa a la proteína de la cápside de VA1 es intracelular y no es tripsina.

Por otro lado, al comparar la curva de crecimiento del astrovirus VA1 con la curva de crecimiento del astrovirus clásico Yuc-8 en la línea celular Caco-2 definida previamente en nuestro laboratorio por la M.C. Leticia Guzmán (tesis de maestría), podemos observar de manera general un retardamiento de la curva de crecimiento del astrovirus VA1. La fase de eclipse para HAstV-8 tiene una duración de alrededor de 7 h, en comparación con VA1 que tiene una duración aproximada de 12 h, es decir, hay un retraso de 5 h, lo que podría indicar que el virus ingresa más lentamente a las células o que el virus tarda más tiempo en desencapsidar su genoma. En la fase de explosión, el HAstV-8 alcanza el máximo a las 15 hpi, mientras que VA1 lo alcanza hasta las 48 hpi, sugiriendo también que este virus se replica más lentamente. Finalmente, la fase estacionaria es alcanzada por HAstV-8 a partir de las 15 hpi hasta las 24 hpi, mientras que para el astrovirus VA1 se alcanza a las 48 h. Las diferencias se pueden deber a un retardamiento en la entrada, desencapsidamiento, replicación, liberación de la célula, o a todos ellos. Estos resultados fueron obtenidos creciendo ambos virus en la línea celular Caco-2; se ha reportado que los astrovirus clásicos infectan enterocitos del intestino delgado en humanos (Sebire et al. 2004), mientras que el astrovirus VA1, además de crecer en células epiteliales, puede crecer en líneas celulares neurales como astrocitos primarios y en SK-N-SH derivada de neuroblastoma (Janowski and Wang 2019). Por lo tanto, las diferencias observadas en los tiempos de replicación pudieran también deberse a la línea celular utilizada y al tropismo del virus.

Todos los experimentos en los que determinamos el título de virus infecciosos en nuestro trabajo se basaron en la técnica de inmunoperoxidasa, que es una técnica de citoquímica que tiene la ventaja de detectar partículas virales infecciosas, ya que se evidencia la replicación viral en las células infectadas al reconocer las proteínas virales recién sintetizadas mediante el uso de anticuerpos específicos. Esto, a diferencia del ensayo de dosis infecciosa media (TCID50) determinado por qRT-PCR, que es la técnica que se ha utilizando en los artículos previos sobre VA1, la que permite cuantificar copias de genoma, pero no determina necesariamente la producción de partículas infecciosas, sino sólo la replicación del genoma.

Los astrovirus clásicos requieren del corte proteolítico de la proteína de la cápside por caspasas, para pasar de VP90 a VP70 y así salir de la célula (Mendez et al. 2002). Posteriormente, en el medio extracelular, el virus es procesado por tripsina para dar origen a la partícula madura conformada por VP34 y VP27. Los experimentos realizados muestran que VA1 no es procesado por caspasas y su inactivación no afecta la progenie viral, sin embargo, experimentos preliminares en el laboratorio han revelado que la infección de VA1 sí activa caspasas, aunque pareciera que no son requeridas para su ciclo de replicación, o al menos no igual manera que los astrovirus clásicos.

Por otro lado, Janowski et al. 2017 reportaron que la replicación del virus VA1 no requiere que el virus sea tratado con tripsina para ingresar a la célula. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que cuando la poliproteína precursora no está ensamblada, o alternativamente está ensamblada en un partícula inmadura (no procesada intracelularmente), con una estructura más laxa, se degrada completamente al ser tratada con tripsina. Contrario a esto, el virus maduro, procesado intracelularmente en las proteínas correspondientes al core (34 kDa) y al spike (38 kDa), no es susceptible al corte por tripsina, lo que es de esperarse dado que el virus infecta naturalmente el tracto gastrointestinal, en presencia de tripsina.

El procesamiento de la cápside viral requerido para la replicación de diferentes virus se ha caracterizado a través del uso de anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones de las proteínas precursoras, como en el caso de los astrovirus clásicos, hepatitis E y hepatitis C, entre otros virus (Grakoui et al. 1993; Mendez et al. 2002; Zhang et al. 1997). En nuestro trabajo, se sintetizó en bacteria tres regiones diferentes de la proteína precursora de la cápside de VA1 e indujimos anticuerpos contra estas 3 regiones en conejos (Figura 20). El ORF2 de VA1 codifica para una poliproteína de 84 kDa, la cual es de menor tamaño que las proteínas precursoras de 91.2 y 85 kDa observadas en los inmunoblots con los anticuerpos DB y α -core (Figura 26); estas diferencias en el peso molecular pueden ser debido a modificaciones post-traduccionales de la proteína precursora, como fosforilación, glicosilación, etc., aunque otra explicación es que la composición específica de aminoácidos y la estructura de la proteína se comporten de manera anómala al ser analizadas en geles de poliacrilamida.

La proteína precursora de VA1 es procesada por una o varias proteasas intracelulares, aun no identificadas, que producen un core de 34 kDa y una espícula de 38 kDa (Figura 26). Esto último se confirmó por medio de secuenciación del extremo N-terminal de la proteína de 38 kDa, la cual comienza en el aminoácido número 388 del ORF2 (Figura 27). El core parece tener un intermediario de 41 kDa y otro de 36 kDa; por otro lado, desconocemos cuantos intermediarios tiene la espícula, sin embargo, de acuerdo al tamaño de las dos proteínas, tanto el core como la espícula parecen ser procesadas en el extremo carboxilo (Figura 27).

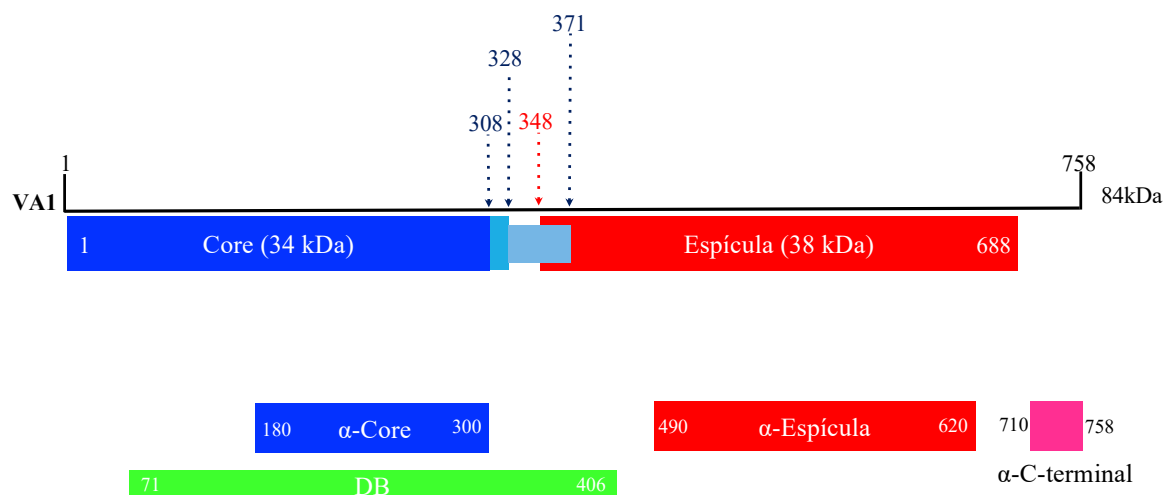


Figura 27. Esquema del ORF2 del astrovirus VA1. Se muestra el core de 34 kDa, junto con los dos intermediarios de 36 y 41 kDa; también se muestra la espícula de 38 kDa. El intermediario del core de 41 kDa se superpone con la secuencia de la espícula. En la parte de abajo se muestran los anticuerpos producidos y los aminoácidos que abarcan.

La razón por la cual las proteínas recombinantes sintetizadas en bacteria, correspondientes a la espícula y al extremo carboxilo terminal de la proteína precursora, no indujeron anticuerpos de buena calidad, no es clara. Esto pudiera haber sido por ser regiones menos inmunogénicas que el core o por el proceso de purificación que incluyó su separación en geles de poliacrilamida con SDS. Con ambos anticuerpos se logró obtener señal para algunas bandas de baja intensidad, no reproducibles, que reconocieron también proteínas de las células Caco-2, lo cual no nos permitió llegar a una conclusión. En el futuro planeamos sintetizar proteínas recombinantes de las mismas regiones, pero de diferente tamaño, en un

esfuerzo para sintetizarlas de manera soluble y potencialmente aumentar su pureza e idealmente su capacidad inmunogénica.

Los resultados obtenidos en esta tesis sientan las bases para profundizar en el estudio de la biología del astrovirus VA1, incluyendo la caracterización de la entrada del virus a diferentes tipos de células y el papel que juega el procesamiento de la poliproteína precursora en este proceso. Este conocimiento será relevante para el eventual diseño de medidas de control para la infección causada por este virus, en particular para el tratamiento de los casos de encefalitis y meningitis que, hasta ahora, han mostrado alta mortalidad.

CONCLUSIONES

El astrovirus VA1 puede crecer en presencia o ausencia de suero bovino fetal, en diferentes tipos de medios celulares.

La proteína de la cápside del virus es procesada dentro de la células, lo cual parece ser necesario para que el virus sea infeccioso.

La curva de crecimiento del astrovirus VA1 es similar a la de los astrovirus clásicos, sin embargo, se observa que es más lento desde etapas tempranas de la infección.

A diferencia de los astrovirus clásicos, la salida del astrovirus VA1 de la células no depende del procesamiento por caspasas de la poliproteína precursora.

La proteína precursora de la cápside del astrovirus VA1 es susceptible al procesamiento proteolítico por tripsina cuando está soluble o ensamblada de manera laxa en partículas inmaduras.

Las proteínas de menor peso molecular que conforman a la partícula infecciosa no son susceptibles al corte por tripsina y éste no modifica la infectividad viral.

La obtención de anticuerpos permitió indentificar 1 o 2 proteínas precursoras de la cápside de 91.2 y 85 kDa, las cuales son procesadas produciendo una espícula de 38 kDa y un core de 36 kDa. El core parece tener un intermediario de 41 kDa y otro de 36 kDa.

PERSPECTIVAS

- Identificar la proteasa que procesa la proteína precursora de la cápside viral.
- Confirmar si el procesamiento de la proteína de la capsida es necesario para que el virus sea infeccioso.
- Realizar nuevos anticuerpos contra la espícula y el extremo carboxilo terminal y otras regiones del ORF2 del astrovirus VA1 para entender mejor el procesamiento de la proteína precursora que lleva a las partículas infecciosas maduras.

REFERENCIAS

- Aguilar-Hernández, Nayeli, Susana López, and Carlos F. Arias. 2018. "Minimal Capsid Composition of Infectious Human Astrovirus." *Virology* 521(May): 58–61.
- Appleton, H., and P. G. Higgins. 1975. "Viruses and Gastroenteritis in Infants." *The Lancet* 305(7919): 1297.
- Arias, Carlos F., and Rebecca M. Dubois. 2017. "The Astrovirus Capsid: A Review." *Viruses* 9(1): 1–13.
- Banos-Lara, Ma del Rocío, and Ernesto Méndez. 2010. "Role of Individual Caspases Induced by Astrovirus on the Processing of Its Structural Protein and Its Release from the Cell through a Non-Lytic Mechanism." *Virology*.
- Bass, D. M., and S. Qiu. 2000. "Proteolytic Processing of the Astrovirus Capsid." *Journal of Virology*.
- Bosch, Albert, Rosa M. Pintó, and Susana Guix. 2014. "Human Astroviruses." *Clinical Microbiology Reviews*.
- Brierley, Ian, and Marijana Vidakovic. 2003. "Ribosomal Frameshifting in Astroviruses." *Perspectives in Medical Virology*.
- Brown, Julianne R. et al. 2015. "Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients." *Clinical Infectious Diseases*.
- Burbelo, Peter D. et al. 2011. "Serological Studies Confirm the Novel Astrovirus HMOAstV-C as a Highly Prevalent Human Infectious Agent." *PLoS ONE*.
- Cortez, Valerie et al. 2017. "Astrovirus Biology and Pathogenesis." *Annual Review of Virology* 4(1): 327–48.
- Dong, Jinhui, Liping Dong, Ernesto Méndez, and Yizhi Tao. 2011. "Crystal Structure of the Human Astrovirus Capsid Spike." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(31): 12681–86.
- Dryden, Kelly A. et al. 2012. "Immature and Mature Human Astrovirus: Structure, Conformational Changes, and Similarities to Hepatitis e Virus." *Journal of Molecular*

Biology.

- Frémond, M. L. et al. 2015. “Next-Generation Sequencing for Diagnosis and Tailored Therapy: A Case Report of Astrovirus- Associated Progressive Encephalitis.” *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*.
- Fuentes, Cristina, Albert Bosch, Rosa M. Pintó, and Susana Guix. 2012. “Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity.” *Journal of Virology*.
- Holtz, Lori R. et al. 2014. “Seroepidemiology of Astrovirus MLB1.” *Clinical and Vaccine Immunology*.
- Jacques, Thomas S. et al. 2015. “Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients.” *Clinical Infectious Diseases*.
- Janowski, Andrew B., Irma K. Bauer, Lori R. Holtz, and David Wang. 2017. “Propagation of Astrovirus VA1, a Neurotropic Human Astrovirus, in Cell Culture.” *Journal of Virology*.
- Janowski, Andrew B., and David Wang. 2019. “Infection and Propagation of Astrovirus VA1 in Cell Culture.” *Current Protocols in Microbiology* 52(1): 1–17.
- Janowski, Andrew B, and Robyn S Klein. 2019. “Differential In Vitro Infection of Neural Cells by Astroviruses.” *mBIO* 10(4): 1–14.
- Kurtz, J. B., T. W. Lee, J. W. Craig, and Sylvia E. Reed. 1979. “Astrovirus Infection in Volunteers.” *Journal of Medical Virology*.
- Lewis, T. L., and S. M. Matsui. 1995. “An Astrovirus Frameshift Signal Induces Ribosomal Frameshifting in Vitro.” *Archives of Virology*.
- Lulla, Valeria, and Andrew Firth. 2019. “A Hidden Gene in Astroviruses Encodes a Cell-Permeabilizing Protein Involved in Virus Release.”
- Lum, Su Han et al. 2016. “An Emerging Opportunistic Infection: Fatal Astrovirus (VA1/HMO-C) Encephalitis in a Pediatric Stem Cell Transplant Recipient.” *Transplant Infectious Disease*.

- Mendez-Toss, M. et al. 2000. "Molecular Analysis of a Serotype 8 Human Astrovirus Genome." *Journal of General Virology*.
- Mendez, E. et al. 2002. "Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein." *Journal of Virology*.
- . 2014. "Characterization of Human Astrovirus Cell Entry." *Journal of Virology* 88(5): 2452–60.
- Mendez, E., E. Salas-Ocampo, and C. F. Arias. 2004. "Caspases Mediate Processing of the Capsid Precursor and Cell Release of Human Astroviruses." *Journal of Virology*.
- Mendez, E., M. P. E. Salas-Ocampo, M. E. Munguia, and C. F. Arias. 2003. "Protein Products of the Open Reading Frames Encoding Nonstructural Proteins of Human Astrovirus Serotype 8." *Journal of Virology*.
- Méndez, Ernesto et al. 2013. "Replication Cycle of Astroviruses." In *Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions*,.
- Naccache, Samia N. et al. 2015. "Diagnosis of Neuroinvasive Astrovirus Infection in an Immunocompromised Adult with Encephalitis by Unbiased Next-Generation Sequencing." *Clinical Infectious Diseases*.
- Quan, Phenix Lan et al. 2010. "Astrovirus Encephalitis in Boy with X-Linked Agammaglobulinemia." *Emerging Infectious Diseases*.
- Reuter, Gábor, Péter Pankovics, and Ákos Boros. 2018. "Nonsuppurative (Aseptic) Meningoencephalomyelitis Associated with Neurovirulent Astrovirus Infections in Humans and Animals." *Clinical Microbiology Reviews* 31(4): e00040-18.
- Ruone, S. et al. 2009. "Identification of a Novel Astrovirus (Astrovirus VA1) Associated with an Outbreak of Acute Gastroenteritis." *Journal of Virology* 83(20): 10836–39.
- Sebire, N. J. et al. 2004. "Pathology of Astrovirus Associated Diarrhoea in a Paediatric Bone Marrow Transplant Recipient." *Journal of Clinical Pathology*.
- Toh, Yukimatsu et al. 2016. "Crystal Structure of the Human Astrovirus Capsid Protein." *Journal of Virology* 90(20): 9008–17.

Vu, Diem Lan, Albert Bosch, Rosa M. Pintó, and Susana Guix. 2017. “Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond.” *Viruses*.

York, Royce L. et al. 2016. “Structural, Mechanistic, and Antigenic Characterization of the Human Astrovirus Capsid.” *Journal of Virology*.